

**Tesis Doctoral**

# **Caracterización funcional de las tiorredoxinas *f* y *m* en *Arabidopsis thaliana***



**Universidad de Granada**

Programa de Doctorado en Bioquímica

y Biología Molecular

**Estación Experimental del Zaidín (CSIC)**

**Juan Fernández Trijueque**

Granada, Noviembre de 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Juan Fernández Trijueque  
ISBN: 978-84-9125-836-0  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43574>





**Caracterización funcional de las Tiorredoxinas *f* y *m*  
de *Arabidopsis thaliana***

Memoria que presenta el licenciado en Bioquímica  
Don Juan Fernández Trijueque para optar al grado de doctor.

Fdo: Juan Fernández Trijueque

Vº Bº del Director y del Co-director del trabajo

Directora de Tesis

Fdo.: Dra. Mariam Sahrawy  
Barragán

Investigadora Científica

Co-director de Tesis

Fdo.: Dr. Antonio Jesús Serrato Recio

Científico titular

Granada, Noviembre de 2015







El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) de Granada, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, gracias a la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, y ha sido financiado por los proyectos BIO2009-07297 concedido por el anterior Ministerio de Ciencia e Innovación de forma conjunta con el Fondo Europeo de Desarrollo Regional, por el BIO2012-33292 del Ministerio de Economía y Competitividad y por los proyectos P07-CVI-2795 y BIO 154 concedidos por la Junta de Andalucía.

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes Congresos Científicos:

IX Reunión de Biología Molecular de Plantas. Celebrado en Santiago de Compostela (España). 2-4 Julio 2008. Participación con póster titulado "Regulación por azúcares y hormonas del estado redox de las plantas" (P106).

X Reunión de Biología Molecular de Plantas. Celebrado en Valencia (España). Organizado por el Departamento Español de Ciencia e Innovación, la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular y la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Participación con póster titulado "Respuesta de las tiorredoxinas de guisante (*Pisum sativum*) frente al estrés salino" (P05-012). 2010.

XXXV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Celebrado en Sevilla (España) 2012. Participación con póster titulado: "Plastid thioredoxins *f* and *m* in *Arabidopsis thaliana*: localization and functional characterization" (P03-60).

Plant Biology Congress Freiburg 2012. Celebrado en Freiburg (Alemania) 2012. Organizado por la FESPB (Federation of European Societies of Plant Biology) y la EPSO (European Plant Science Organisation). Participación con póster titulado "Localization and functional characterization of the plastid thioredoxins *f* and *m* in *Arabidopsis thaliana*" (P-9-16).

XIII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Celebrado en Lisboa (Portugal) 2013. Participación con póster titulado: "Physiological and proteomic survey of *Arabidopsis thaliana* thioredoxins *f* and *m* knock-out lines" (S5-P25).

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM).  
Celebrado en Granada, 9-12 Septiembre 2014. Participación con póster titulado: “Análisis proteómico en plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes en las Tiorredoxinas *f* y *m* plastidiales” (P08-3).

Así mismo, parte de los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos:

**Fernández-Trijueque, J., de Dios Barajas-López, J., Chueca, A., Cazalis, R., Sahrawy, M., & Serrato, A. J.** (2012). Plastid thioredoxins *f* and *m* are related to the developing and salinity response of post-germinating seeds of *Pisum sativum*. *Plant science*, 188, 82-88.

**Serrato, A. J., Fernández-Trijueque, J., Juan-de-Dios Barajas-López, A., & Chueca, M. S.** (2013). Plastid thioredoxins: a “one-for-all” redox-signaling system in plants. *Frontiers in plant science*, 4.





El Doctorando D. Juan Fernández Trijueque y los Directores de la tesis, la Dra. Mariam Sahrawy Barragán y el Dr. Antonio Jesús Serrato Recio, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Noviembre 2015.

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:



---

I.- INTRODUCCIÓN .....	1
A.- Tiorredoxinas.....	3
A.1.- Características generales. ....	3
A.2.- Estructura. ....	4
A.3.- Funciones generales.....	8
A.4.- Mecanismo catalítico de reacción. ....	9
B.- TRXs vegetales. ....	11
B.1.- Diversidad de TRXs en vegetales.....	11
B.2.- TRXs plastidiales ....	13
B.3.- TRXs citosólicas. ....	15
B.4.- TRXs mitocondriales.....	17
B.5.- Nucleorredoxinas. ....	18
C.- TRXs plastidiales.....	18
C.1.- Sistemas de reducción. ....	18
C.2.- Dianas moleculares. ....	22
C.3.- Mecanismos de regulación redox de las dianas. ....	28
C.4.- Funciones bioquímicas y fisiológicas.....	30
C.5.- Regulación de la actividad de TRXs plastidiales. ....	46
II.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
A.- Sección I: Material biológico.....	51
A.1.- <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	51
A.2.- Guisante ( <i>Pisum sativum</i> ).....	51
A.3.- <i>Escherichia coli</i> . ....	52
A.4.- <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....	53
A.5.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	53
B.- Sección II: Análisis y manipulación de ácidos nucleicos. ....	54

B.1.- Vectores.....	54
B.2.- Oligonucleótidos. ....	59
B.3.- Aislamiento de ADN genómico de tejidos vegetales.....	65
B.4.- Aislamiento de plásmidos. ....	65
B.5.- Preparación de muestras de tejidos vegetales para análisis genotípicos por PCR.....	65
B.6.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	66
B.7.- PCR de colonias. ....	66
B.8.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa. ....	67
B.9.- Purificación de fragmentos de ADN en agarosa. ....	67
B.10.- Restricción de ADN plasmídico.....	67
B.11.- Ligación de ADN.....	67
B.12.- Mutagénesis dirigida mediante PCR.....	68
B.13.- Secuenciación de ADN. ....	69
B.14.- Aislamiento de ARN total de tejidos vegetales.....	69
B.15.- Síntesis de ADNc.....	69
B.16.- RT-PCR semicuantitativa.....	70
B.17.- RT-PCR cuantitativa. ....	70
C.- Sección III: Métodos de análisis y manipulación de proteínas. ....	71
C.1.- Aislamiento y cuantificación de proteínas.....	71
C.2.- Separación de proteínas mediante SDS-PAGE. ....	73
C.3.- Tinción de proteínas con azul de Coomassie. ....	74
C.4.- Inmunodetección de proteínas mediante la técnica de <i>western-blotting</i> . .....	75
C.5.- Electroforesis bidimensional. ....	76
C.6.- Análisis de péptidos por espectrometría de masas. ....	77
C.7.- Técnicas de cromatografía de afinidad.....	78
C.8.- Determinaciones enzimáticas.....	80

---

D.- Sección IV: Métodos de transformación genética. ....	81
D.1.- <i>Escherichia coli</i> . ....	81
D.2.- <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....	83
D.3.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	83
D.4.- Crio-conservación de cepas bacterianas. ....	84
D.5.- <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	84
E.- Sección V: Métodos de caracterización fisiológica. ....	86
E.1.- Caracterización <i>in vitro</i> . ....	86
E.2.- Caracterización de plantas de <i>Arabidopsis</i> sembradas en tierra. ....	88
E.3.- Tinción de hojas con lugol. ....	88
E.4.- Extracción de azúcares solubles y almidón. ....	89
E.5.- Determinación del contenido de azúcares solubles y almidón. ....	89
E.6.- Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos. ....	92
E.7.- Técnicas de microscopía. ....	93
E.8.- Determinación de parámetros fotosintéticos. ....	94
E.9.- Tinción histoquímica para $\beta$ -glucuronidasa (GUS). ....	97
E.10.- Medida del contenido en ROS. ....	98
F.- Sección VI: Software informático y recursos <i>on-line</i> . ....	98
F.1.- Software para análisis de ácidos nucleicos y proteínas. ....	98
F.2.- Software para tratamiento de imágenes. ....	99
F.3.- Software para análisis de parámetros fotosintéticos. ....	99
F.4.- Recursos <i>on-line</i> utilizados. ....	99
III.- OBJETIVOS .....	103
IV.- RESULTADOS .....	109
A.- Expresión y localización de TRXs <i>f</i> y <i>m</i> de <i>Arabidopsis</i> . ....	111
A.1.- Expresión génica en diferentes órganos. ....	111
A.2.- Estudio " <i>in silico</i> " del contenido de proteínas en distintos órganos... ..	111

A.3.- Búsqueda de motivos reguladores en las secuencias promotoras. ..	113
A.4.- Localización en tejidos y órganos. ....	119
B.- Estudios <i>in vitro</i> con las formas purificadas de las TRXs <i>f</i> y <i>m</i> de Arabidopsis. .....	137
B.1.- Expresión y purificación de TRXs recombinantes.....	137
B.2.- Inmunodetección de las proteínas recombinantes purificadas. ....	138
B.3.- Especificidad funcional de las TRXs <i>f</i> y <i>m</i> de Arabidopsis en la activación redox de la FBPasa. ....	139
B.4.- Búsqueda de dianas para las TRXs <i>f1</i> y <i>f2</i> en extractos de inflorescencias y raíces. ....	142
C.- Estudio de líneas defectivas en TRXs <i>f</i> y <i>m</i> de Arabidopsis. ....	152
C.1.- Aislamiento de mutantes knock out y evaluación de la supresión génica. .....	152
C.2.- Caracterización fisiológica. ....	158
C.3.- Caracterización del proceso fotosintético. ....	172
C.4.- Adaptaciones del metabolismo de carbohidratos en respuesta a la ausencia de cada isoforma de TRX <i>f</i> o <i>m</i> .....	178
C.5.- Análisis del proteoma de las líneas mutantes <i>trxf</i> y <i>m</i> . ....	187
D.- Estudio de líneas defectivas en TRXs <i>f</i> y <i>m</i> de Arabidopsis en condiciones de estrés. ....	204
D.1.- Respuesta y adaptación al estrés por luz. ....	204
D.2.- Respuesta y adaptación al estrés oxidativo.....	205
E.- Respuesta a la salinidad de las TRXs <i>f</i> y <i>m</i> durante el estadio post- germinativo de Arabidopsis y guisante. ....	212
E.1.- Expresión génica de AtTRXs <i>f</i> y <i>m</i> en plántulas de Arabidopsis sometidas a estrés salino. ....	212
E.2.- Expresión de los promotores de <i>PsTRXf</i> y <i>PsTRXm1</i> en plantas etioladas. ....	213

---

E.3.- Búsqueda de elementos reguladores relacionados con salinidad en regiones promotoras de <i>PsTRXf</i> y <i>PsTRXm1</i> . .....	215
E.4.- Análisis de la expresión de <i>PsTRXsf</i> y <i>m</i> en plántulas en fase post-germinativa del desarrollo. ....	215
E.5.- Análisis de la expresión de <i>PsTRXs f</i> y <i>m</i> en órganos fotosintéticos y heterotróficos de plántulas de guisante en respuesta a NaCl. ....	217
E.6.- Crecimiento de cepas de levadura complementadas con <i>PsTRXs</i> en medios hipersalinos.....	221
V.- DISCUSIÓN .....	225
A.- Expresión y localización de las <i>TRXs f</i> y <i>m</i> en órganos fotosintéticos y no fotosintéticos. ....	227
B.- Actividad y dianas de isoformas purificadas de las <i>TRXs f</i> y <i>m</i> de <i>Arabidopsis</i> . ....	230
C.- Funciones fisiológicas específicas no redundantes de las distintas isoformas de <i>TRXs f</i> y <i>m</i> . ....	231
D.- Distribución y rol de las <i>TRXs f</i> y <i>m</i> durante la germinación de semillas y estadios tempranos de desarrollo de la plántula.....	234
VI.- CONCLUSIONES - CONCLUSIONS.....	243
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	251
VIII.- APÉNDICES .....	271
A.- Contenido suplementario.....	273
B.- Abreviaturas. ....	277
C.- Índice de figuras.....	282
D.- Índice de tablas.....	296











# **I.- INTRODUCCIÓN**



## A.- Tiorredoxinas.

### A.1.- Características generales.

El ambiente reductor del interior de la célula es el que provoca que, en la mayoría de los residuos de Cys (C) de las proteínas se mantengan en estado reducido (Gilbert, 1993). Debido a ello las células necesitan unos sistemas de control del estado de oxidación reducción de los enlaces disulfuro muy eficientes. El control a través de las tiorredoxinas (TRXs), es junto con otros sistemas redox, una de las principales vías de reducción.

Las TRXs constituyen una familia de proteínas antioxidantes de entre 12-14 kD, ubicuas, termoestables y presentes en todos los organismos. Fueron descritas por primera en *Escherichia coli* como enzimas reductoras eficientes de puentes disulfuro que transferían poder redox a la ribonucleótido reductasa (RNR), una proteína necesaria para la síntesis de ADN, tras ser reducidas previamente por una NADPH-tiorredoxín reductasa (NTR) (Laurent et al., 1964; Moore et al., 1964).

Estudios posteriores hicieron evidente que las TRXs desempeñan adicionalmente otras funciones celulares. Así se ha comprobado que pueden actuar como reductasas en el control redox (Holmgren, 1985), evitar procesos de agregación e inactivación oxidativa de proteínas (Holmgren, 1985, 1989, 1995; Holmgren and Björnstedt, 1995), intervienen en los procesos de defensa frente a diferentes estreses ambientales tales como las especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), peroxinitritos y arseniatos (Landino et al., 2004; Messens and Silver, 2006); regulan la apoptosis a través de la desnitrosilación (Ravi et al., 2005; Benhar et al., 2008); actúan como factor de crecimiento (Powis et al., 2000), modulan la respuesta inflamatoria (Nakamura et al., 2005); promueven el plegamiento de proteínas (Kern et al., 2003); e intervienen en la regulación en los ciclos de vida de los virus y fagos (Holmgren, 1989).

A nivel subcelular, las TRXs aparecen ubicadas en diversos compartimentos a pesar de que su codificación mayormente es nuclear. Algunas TRXs de la familia son abundantes en el citosol (Arnér and Holmgren, 2000), mientras que otras se translocan al núcleo (Hirota et al., 1997; Hirota et al., 1999) o a las mitocondrias y a los plastidios vegetales. También aparecen asociadas en la membrana celular (Martin and Dean, 1991) o son secretadas al medio extracelular (Arnér, 1999; Xu et al., 2008).

Todas las TRXs tienen un motivo catalítico altamente conservado constituido por la secuencia de aminoácidos Trp-Cys-Gly/Pro-Pro-Cys (WCG/PPC), la cual se localiza en una región muy conservada de la estructura de la molécula. Los residuos de Cys del motivo son clave en la actividad catalítica rompiendo los enlaces disulfuro en las proteínas sustrato oxidadas. Al término de un ciclo catalítico, estos dos residuos de Cys se oxidan y forman un puente disulfuro. Se convierten de nuevo al estado reducido por medio de distintos sistemas tiorredoxina-reductasas, dependiendo de su localización subcelular.

En su estado reducido, todas las TRXs son capaces de reducir a su vez los puentes disulfuro de otras proteínas de manera que, aunque todas tienen una masa molecular parecida y sus propiedades redox similares, son moléculas con una alta especificidad funcional debido a una complementariedad estructural muy particular y específica entre cada TRX y sus dianas.

La primera descripción estructural de una TRX fue realizada hace 40 años (Holmgren et al., 1975), y desde entonces no ha parado de aumentar el número de estructuras resueltas para isoformas de distintas especies..

## **A.2.- Estructura.**

Las TRXs presentan una estructura globular y compacta característica, constituida por una lámina  $\beta$  de 5 hojas, 3 paralelas y 2 antiparalelas, que es hidrofóbico rodeado de 4 hélices  $\alpha$  (Eklund et al., 1984). La secuencia de la estructura secundaria de todas las TRXs es la misma:  $\beta$ 1,  $\alpha$ 1,  $\beta$ 2,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 3,  $\alpha$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5 y  $\alpha$ 4 (Figura 1).

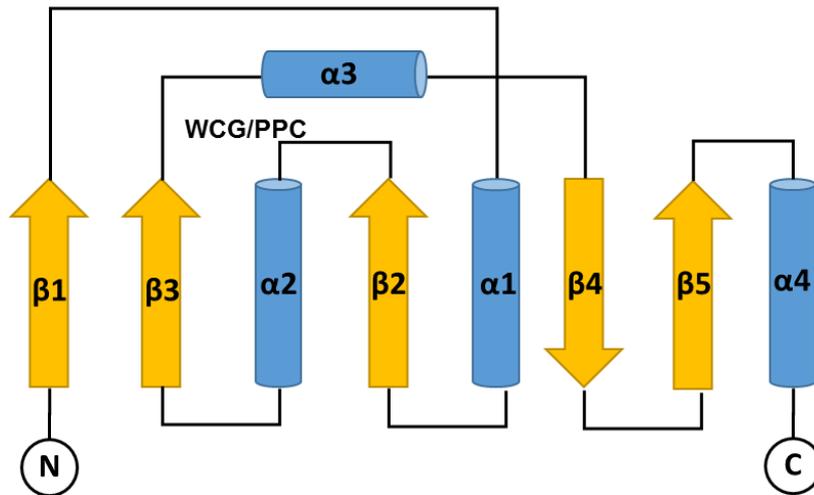


Figura 1.- Esquema del plegamiento tioredoxina típico. El sitio activo (WCG/PPC) se localiza en el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha 2$ . N: extremo amino-terminal; C: extremo carboxi-terminal.

Esta secuencia puede dividirse en dos regiones: los motivos  $\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2\beta 3$  constituyen la región amino-terminal mientras que  $\beta 4\beta 5\alpha 4$  son carboxi-terminales; ambas subsecuencias están conectadas por la hélice  $\alpha 3$ . Las hojas  $\beta$  de la región amino-terminal tienen orientación paralela, mientras que las hojas  $\beta$  del motivo carboxi-terminal tienen orientación anti-paralela.

Las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  se encuentran en un lado de la  $\beta$ -hoja central, mientras que la hélice  $\alpha 3$  se encuentra en el lado opuesto. La hélice  $\alpha 3$  está orientada perpendicularmente a las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$ . El motivo catalítico WCG/PPC se encuentra en la superficie de la proteína, en un segmento corto en el extremo amino de la hélice  $\alpha 2$ .

Una versión más corta de esta estructura, carente de la hebra  $\beta 1$  y la hélice  $\alpha 1$ , se conoce como "plegamiento TRX" (Martin, 1995). El plegamiento TRX constituye la estructura completa de las glutarredoxinas (Xia et al., 2001); también ha sido observado en las proteínas disulfuro isomerasas (PDI) (McCarthy et al., 2000; Heras et al., 2004), en las disulfuro oxidasas (Seto et al., 1993), en los transportadores de electrones de la membrana como DsbD (Katzen and Beckwith, 2000; Haebel et al., 2002), en las glutatión transferasas (Reinemer et al., 1991), y glutatión peroxidasas (Ren et al., 1997), en los canales de cloruro intracelulares (Harrop et al., 2001) y en la proteína DsbG (Heras et al., 2004; Depuydt et al., 2009).

La naturaleza ha utilizado este tipo de plegamiento como una estructura terciaria bien definida, estable y altamente conservada para tareas particulares a lo largo de la evolución de las proteínas (Eklund et al., 1991; Pan and Bardwell, 2006). La mayoría de las proteínas con un plegamiento TRX presentan un motivo catalítico CXXC conservado.

Existen varios residuos conservados que desempeñan importantes funciones estructurales y catalíticas entre las TRXs (Figura 2). Entre ellos, están los residuos de Cys que, localizados en el sitio catalítico, resultan esenciales para la actividad de TRX. Los otros residuos conservados si bien no son estrictamente necesarios para la actividad enzimática, dictan las propiedades termodinámicas y redox de la proteína.

En primer lugar se destacan 3 Pro (P) conservadas. Una de ellas se encuentra situada entre los residuos de Cys del motivo catalítico WCG/PPC y es clave para determinar el poder reductor de la TRX; sustituyéndola por una Ser (S) o una Thr (T) tiene un efecto notable sobre las propiedades redox y la estabilidad de la proteína (Gleason et al., 1990; Krause et al., 1991; Chivers and Raines, 1997; Mossner et al., 1998; Schultz et al., 1999; Roos et al., 2007; Lewin et al., 2008). La segunda Pro se encuentra 5 residuos aguas arriba del motivo catalítico e introduce un estrechamiento en la hélice  $\alpha_2$  que separa el motivo WCG/PPC, situado en el extremo amino, del resto de dicha hélice. La mutación de este residuo desestabiliza la estructura de la TRX, pero no tiene efecto sobre las propiedades redox de la proteína (de Lamotte-Guéry et al., 1997; Chakrabarti et al., 1999). La tercera Pro aparece en el lado opuesto del motivo de sitio activo y se encuentra en conformación *cis* (*cis*-Pro), siendo importante en el mantenimiento de la conformación del sitio activo y del potencial redox de la proteína. Sustituyéndola por una alanina (Ala, A) provoca una disminución sobre la eficiencia de la catálisis (Gleason, 1992).

Junto a esta última *cis*-Pro se localiza una Thr conservada. Este residuo está involucrado en la estructuración de la región opuesta al motivo del sitio activo. El oxígeno de la cadena lateral (O $\gamma$ 1) de esta Thr establece interacciones con los oxígenos de la cadena de la *cis*-Pro y del residuo anterior (Eklund et al., 1991).

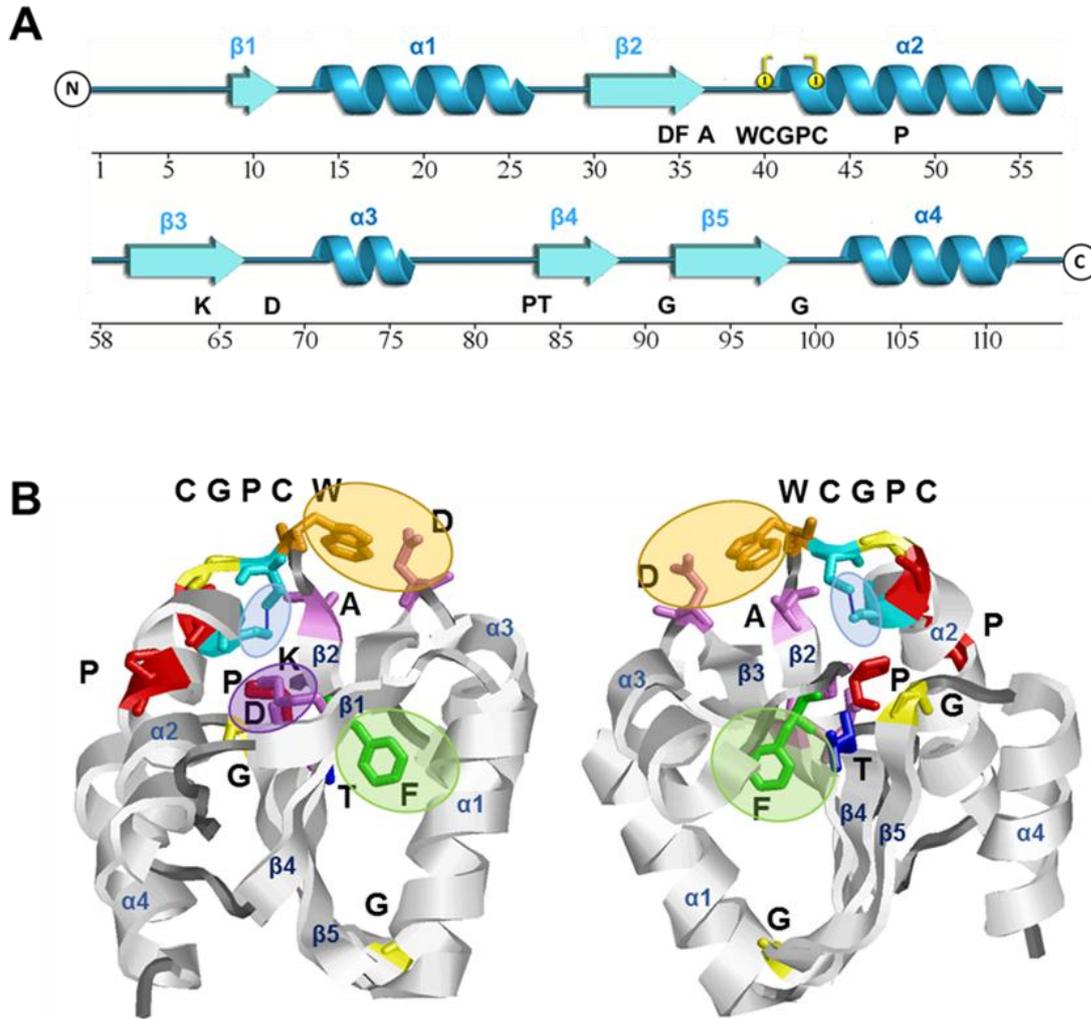


Figura 2.- A) En la parte inferior de la estructura secundaria se muestran, en código de una letra, los residuos conservados de la estructura de la TRX h1 de *A. thaliana*, código PDB nº 1XFL (Peterson et al., 2005). B) las regiones conservadas se encuentran en el centro y alrededor del sitio activo de la TRX vistos desde dos posiciones diferentes (anterior y posterior). Los restos conservados en la estructura de la proteína se muestran en la presentación siguiendo un modelo tipo stick con diferentes colores: Trp (naranja), residuos cargados (magenta), Cys (cian), Gly (amarillo), Phe (verde), la Thr (azul) y Pro (rojo). La región hidrofóbica (verde), la región cargada (magenta), el grupo estructural expuesto (naranja) y el puente disulfuro (cian) se indican con una forma oval semitransparente. El centro activo solo es accesible para las reacciones de catálisis enzimática desde un lado de la proteína, representado en la figura de la derecha.

Se encuentran igualmente conservados 3 residuos de Gly (G). El primero, se encuentra en el propio motivo WCG/PPC dónde mantiene la conformación del sitio activo e influye en el potencial redox. Los otros dos aparecen en los flancos de la hebra  $\beta 5$  y determinan su longitud, siendo estructuralmente importantes, porque aparecen posiciones equivalentes para este tipo de giros en otras estructuras (Kuntz, 1972; Rose, 1978).

También son importantes algunos residuos aromáticos conservados como es el caso de la Phe (F) situada al final de la hebra  $\beta 2$ , la cual constituye una región hidrófoba interna (forma oval verde en la Figura 2) junto con dos residuos de Ile (I) y Val (V) de la lámina  $\beta$  central (Eklund et al., 1991). Esta agrupación es estructuralmente importante ya que posiciona la hélice  $\alpha 1$  correctamente. También hay un Trp (W) conservado, que se encuentra inmediatamente antes de la secuencia del motivo WCG/PPC. Este residuo es importante para la estabilidad termodinámica de las TRXs (García-Pino et al., 2009). La Ala conservada que se sitúa en el giro anterior al Trp se encuentra unida mediante fuerzas de tipo Van Der Waals con este residuo. Es importante la presencia de un residuo pequeño como una Ala en esta posición, ya que uno de mayor tamaño modificaría la posición de la cadena lateral indol. Tanto el Trp como la Ala forman un grupo estructural en el que también hay un Asp (D) conservado situado en el giro entre la hebra  $\beta 3$  y la hélice  $\alpha 3$  (Figura 2, ovalo naranja).

Finalmente, las TRXs contienen otros dos residuos, un Asp con carga negativa y una Lys (K) con carga positiva, situados ambos en las hebras  $\beta 2$  y  $\beta 3$  (Eklund et al., 1984) que forman parte de una región cargada entre la hebra  $\beta$  y la hélice  $\alpha 2$  (Figura 2, ovalo púrpura). Esta región está protegida gracias al enlace disulfuro que se forma durante el estado oxidado de la proteína. Este Asp conservado, se consideró durante mucho tiempo como el residuo clave de la activación de la Cys C-terminal del motivo WCG/PPC, dónde actuaría como un agente nucleófilo (Chivers and Raines, 1997; Menchise et al., 2001). Sin embargo, otros resultados indican que el tiol C-terminal puede ser activado incluso en ausencia de este Asp (Roos et al., 2009a).

### **A.3.- Funciones generales.**

Los estudios realizados hasta la actualidad han permitido clasificar las funciones de las TRXs en tres grupos:

- En primer lugar, las TRXs pueden actuar transfiriendo poder reductor en una cascada secuencial oxidorreductora, donde los electrones cedidos pueden participar por ejemplo en la reducción de agentes oxidantes tóxicos para la célula.

- También pueden actuar cediendo electrones que rompen puentes disulfuro estructurales de muchas enzimas, generalmente, esta ruptura produce un cambio conformacional en la proteína diana y consigue modular su actividad, pasando de un estado inactivo al estado activo y viceversa. El cambio de estado de tiol a disulfuro se ha establecido como un tipo de modificación postraduccional que regula la actividad de numerosas proteínas cuyo espectro de acción, va desde factores de transcripción para la replicación viral a las enzimas metabólicas y proteínas de almacenamiento.
- Por último, las TRXs ejercen funciones independientes de su actividad reductora, pudiendo realizar roles estrictamente estructurales, como la actividad chaperona.

Las funciones englobadas en los dos primeros grupos descritos son dependientes de la capacidad de las TRXs para ceder electrones mediante un mecanismo catalítico de reacción bien conocido.

#### **A.4.- Mecanismo catalítico de reacción.**

La reacción catalizada por TRXs es una reacción de sustitución nucleófila bimolecular (Figura 3), que esencialmente funciona como una transferencia de enlace disulfuro de la proteína diana a la TRX en un solo ciclo catalítico, a pesar del ambiente reductor del compartimento en el que están situados generalmente. Una vez establecido, el enlace disulfuro en la proteína diana funciona como un interruptor redox (Wouters et al., 2007).

Diversos factores afectan a la tasa de intercambio de tiol-disulfuro, entre ellos el pKa de la Cys nucleófila (Shaked et al., 1980), el entorno electrostático local de los amino ácidos cercanos (Bulaj et al., 1998; Hansen et al., 2005), la geometría para formar un estado de transición lineal (Fernandes and Ramos, 2004), la isoforma molecular (Østergaard et al., 2001) y la entropía (Bulaj and Goldenberg, 2001). Por otra parte, el pH del disolvente circundante (Setterdahl et al., 2003) y los valores de pKa de los grupos tiol que salen del sustrato oxidado (Shaked et al., 1980) también determinan la velocidad de la reacción-tiol disulfuro.

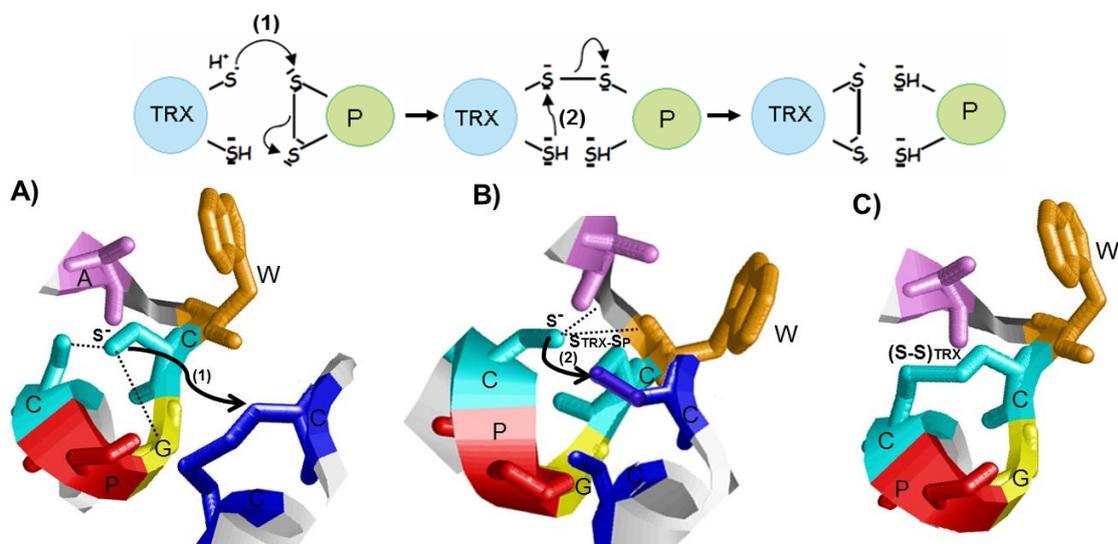


Figura 3.- Mecanismo de reducción de proteínas diana mediado por TRXs. Una representación esquemática paso por paso del mecanismo de reacción se muestra en la parte superior. A) La reacción se inicia con un ataque nucleofílico sobre la Cys N-terminal del motivo conservado WCGPC (1). El tiolato de la Cys nucleofílica se estabiliza por dos enlaces de hidrógeno con el grupo NH de la Gly y el grupo SH de la Cys C-terminal (código PDB: 1XFL). B) Como resultado, se forma un complejo de disulfuro mixto intermedio entre la TRX y la proteína diana, que a su vez es reducido por un ataque nucleofílico de la Cys C-terminal del motivo WCGPC (2). El tiolato en la Cys C-terminal se estabiliza con dos enlaces de hidrógeno de amida de cadena principal, lo que disminuye su pKa de 7,4. Para ser más susceptible al ataque nucleofílico de la Cys C-terminal, la Cys N-terminal de la TRX se encuentra estéricamente más cerca de ésta. C) El ciclo de reducción catalítica se detiene con la liberación de una proteína diana reducida y la TRX oxidada

La reacción comienza con un ataque nucleofílico del grupo tiol N-terminal del motivo CGPC sobre el puente disulfuro de la proteína diana, liberando un grupo tiol y estableciendo un disulfuro mixto entre la TRX y la proteína diana (Figura 3). Esta primera etapa del mecanismo depende del bajo valor de pKa ( $\sim 7$ ) de la Cys N-terminal del motivo WCGPC (Dyson et al., 1991; Dillet et al., 1998), el cual es significativamente menor que el pKa de los residuos de Cys libre en solución ( $\sim 9$ ). En condiciones fisiológicas, el S de la Cys N-terminal está presente como un tiolato, lo que permite a este residuo actuar como un nucleófilo, atacando al puente disulfuro de las proteínas diana. Los bajos valores de pKa resultan de la estabilización de la carga negativa del anión tiolato a través de la formación de enlaces de hidrógeno entre el S de la Cys y sus residuos vecinos (Figura 3A) (Foloppe et al., 2001). En contraste, el S de la Cys C-terminal tiene un pKa alto ( $\sim 9$ ) y está presente como un tiol (Bulaj et al., 1998; Lutolf et al., 2001). Esto contribuye a la estabilidad del tiolato N-terminal, y por lo tanto al aumento de la velocidad de reacción.

Una vez que el puente disulfuro mixto ha sido formado entre la TRX y la proteína diana, el grupo tiol C-terminal tiene que ser estabilizado como un tiolato para permitir la disociación del complejo disulfuro mixto-TRX (Figura 3B). Esta estabilización se produce entre la Cys C-terminal y las amidas del esqueleto carbonado del Trp del sitio activo y de la Cys N-terminal (Li et al., 2007; Roos et al., 2009a). Como consecuencia, el pKa de la Cys C-terminal en el complejo de disulfuro mixto desciende (Roos et al., 2009a) (Figura 3B), sólo teniendo que ser baja durante una fracción de segundo para que tenga lugar un ataque nucleófilo (Roos et al., 2009a). Una estabilización transitoria del tiolato es suficiente para permitir la disociación del complejo mixto disulfuro.

El último paso del ciclo catalítico (Figura 3C) consiste en la disociación del complejo. Para ello la Cys C-terminal de la TRX ataca el complejo disulfuro mixto en la Cys N-terminal de la TRX liberando la proteína reducida y la TRX oxidada (Roos et al., 2009a; Roos et al., 2009b).

Las TRXs, oxidadas durante este proceso, se vuelven a reducir entonces de nuevo por distintas reductasas (dependiendo de la localización celular), permitiendo a la proteína iniciar otro ciclo de reacción.

## **B.- TRXs vegetales.**

### **B.1.- Diversidad de TRXs en vegetales.**

Las plantas son organismos fotosintéticos eucariotas y sésiles que han colonizado multitud de entornos terrestres a pesar de que parámetros tan importantes como la luz, la temperatura o el agua sufren fluctuaciones ambientales que continuamente desafían la vida de la planta. El éxito de esta adaptación se encuentra parcialmente en la señalización redox versátil y regulación ejercida por las TRXs y otras familias de proteínas con actividad tiol disulfuro reductasa (König et al., 2012). En los últimos años, el aislamiento y análisis de los genomas completos (como es el caso de *A. thaliana* y *Oryza sativa*) ha posibilitado la descripción de las propiedades de esta familia de proteínas, incluso en casos en los que aparecen débilmente expresadas.

En comparación con otros organismos que cuentan con un número de entre 1 a 3 genes codificantes cumpliendo diversas funciones fisiológicas, las plantas terrestres se caracterizan por tener una notable diversidad de TRXs. Así, hasta la fecha se conocen alrededor de 50 genes (Meyer et al., 2008; Chibani et al., 2009; Meyer et al., 2012) algunos de ellos sin ninguna función asignada. Esta diversidad podría estar asociada bien con procesos de redundancia funcional o bien con procesos de especialización.

La redundancia funcional ha sido defendida basándose en la existencia de miembros pertenecientes a grandes subgrupos plastidiales que comparten secuencia y características bioquímicas similares (Wang et al., 2013). No obstante, en estos casos también podría ocurrir que distintos patrones de expresión espacial y temporal resulten en funciones fisiológicas únicas. La especialización ha sido justificada en base a que varias TRXs de plantas se expresan en tipos específicos de células o de tejidos, cumpliendo funciones únicas y especializadas, tales como las relacionadas con las respuestas al estrés o el desarrollo.

La multiplicidad de las distintas isoformas de TRXs que se encuentran en *A. thaliana*, llevó a plantear la necesidad de establecer una clasificación que tuviera en cuenta la localización, la especificidad y la función para cada una de ellas. Así fueron inicialmente clasificadas en 15 subgrupos de acuerdo con su ubicación subcelular y similitud de secuencias (Meyer et al., 2012) presentes en todos los genomas de plantas vasculares que se han secuenciado hasta el momento, desde briofitas, pasando por licofitas y algas eucarióticas e incluso en las cianobacterias (Chibani et al., 2009). En estas se incluyen las TRXs típicas (portadoras de un sitio activo conservado WCG/PPC) y las conocidas como TRXs-*like*, proteínas con sitios activos atípicos, múltiples dominios TRXs o con motivos TRX asociados con otros dominios. Si bien algunas de estas últimas proteínas no han sido bien caracterizadas en términos de actividades bioquímicas y sistemas de reducción, la mayoría de TRXs y TRXs-*like* han sido expresadas en *E. coli*, permitiendo el análisis de su mecanismo de reacción.

## B.2.- TRXs plastidiales

Las TRXs *m* y *f* fueron los primeros tipos de TRXs plastidiales descritas en plantas (Jacquot et al., 1976; Kagawa and Hatch, 1977; Buchanan et al., 1978; Jacquot et al., 1978; Wolosiuk et al., 1979). Desde entonces y gracias al análisis de secuencias del genoma de plantas se descubrieron los tipos CDSP32 (Broin et al., 2002), TRXx (Mestres-Ortega and Meyer, 1999; Collin et al., 2003), TRXy (Lemaire et al., 2003; Collin et al., 2004), TRXz (Rivas et al., 2004; Pfalz et al., 2006; Arsova et al., 2010), WCRKC (Cain et al., 2009) y *Lilium* (Meyer et al., 2008), recientemente renombradas posteriormente como familia ACHT del inglés *Atypical Cys His-rich TRXs* (Dangoor et al., 2009).

Los tipos *f* y *m* toman su denominación de las dianas moleculares con las que fueron relacionadas inicialmente (Schürmann et al., 1976). Así, la TRX *f* proviene de la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica 1 (cFBP1) mientras la TRX *m* deriva de la malato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (NADP<sup>+</sup>-MDH).

En el caso de las isoformas *x* e *y*, fueron descubiertas por homología estructural con las anteriores y englobadas dentro de la familia de las TRXs plastidiales (Collin et al., 2003; Collin et al., 2004).

A pesar de ser inicialmente conocida como un ortólogo en *Solanum lycopersicum* (denominado CITRX) que interaccionaba con la proteína citosólica Cf-9 (Rivas et al., 2004) y que se identificó como un componente de los plastidios transcripcionalmente activos en mostaza (*Sinapis alba*) y *A. thaliana* (Pfalz et al., 2006), no fue hasta 2010 cuando se incluyó a la TRX *z* como miembro del grupo de las TRXs plastidiales (Arsova et al., 2010).

Los estudios filogenéticos y las comparaciones de secuencias entre TRXs plastidiales han demostrado que, mientras las TRXs *m*, *x*, *y*, y *z* son de origen procariota (Sahrawy et al., 1996; Arsova et al., 2010), las TRX *f* están estrechamente relacionadas con las TRXs eucariotas de tipo *h* (Sahrawy et al., 1996; Issakidis-Bourguet et al., 2001).

La diversificación de las TRXs refleja la complejidad de la red plastidial redox y el alcance del papel desempeñado en la fisiología de las plantas. En los últimos

años, debido principalmente a la disponibilidad de colecciones de líneas mutantes, muchos estudios sobre TRXs plástidales se han centrado en el modelo vegetal *A. thaliana*. En este organismo se han descrito dos isoformas de TRX *f*, cuatro *m*, dos *y*, una *x* y una *z*. En guisante existen tres tipos de TRXs plastidiales descritas, un tipo TRX *f* (Lepiniec et al., 1992) y 2 dos TRXs tipo *m*: PsTRX *m1* (Jaramillo et al., 1994) y *m2* (GenBank ID: AJ316577).

Los plástidos también contienen a otras proteínas TRXs-*like* de mayor tamaño y con dominios TRX asociados a otros dominios funcionales. Es el caso de la APS reductasa (Setya et al., 1996; Martin et al., 2005) y la NTRC (Serrato et al., 2004).

Si bien la mayoría de TRXs plastidiales se encuentran en el estroma plastidial, por sus características estructurales dentro de este grupo se incluye también a la HCF164, la primera TRX-*like* identificada en plantas (Lennartz et al., 2001). Se trata de una proteína transmembrana que conecta el lumen tilacoidal con el estroma y que muestra actividad disulfuro reductasa, transmitiendo señales redox entre ambos compartimentos en un mecanismo en el que se encuentra implicada la proteína CcdA (*Cytochrome c-type biogenesis ccda-like chloroplastic protein*) (Page et al., 2004; Motohashi and Hisabori, 2006). La CcdA no tiene propiamente un motivo TRX, pero es homóloga a las proteínas bacterianas que ayudan a la formación de disulfuro en las proteínas secretadas por la mediación del movimiento de los equivalentes redox entre el citoplasma bacteriano y el periplasma.

En los últimos años se ha informado de una TRX-*like* de localización luminal denominada LTO1 (*Lumen thiol oxidoreductase 1*). Esta proteína consta de dos dominios, de los cuales el N-terminal es homólogo a la vitamina K reductasa de mamíferos (Karamoko et al., 2011), mientras que el segundo tiene una secuencia TRX-*like* con homología con la tiol oxidoreductasa bacteriana DsbA (Feng et al., 2011), miembro del mismo sistema transportador procarionta que la proteína CCDA (Kadokura et al., 2003).

Hasta hace una década se pensaba que la localización en órganos y tejidos de las TRXs plastidiales estaba restringida casi exclusivamente a tejidos verdes

dónde actuaban en roles relacionados con la fotosíntesis y el metabolismo del carbono (Wolosiuk and Buchanan, 1977; Schürmann et al., 1981).

Sin embargo, ensayos de inmunolocalización, hibridación *in situ*, PCR cuantitativa y *western-blotting* diseñados para localizar la expresión de los genes *PsTRXf* y *PsTRXm1* revelaron distintos patrones de expresión en guisante, que situaba estas TRXs, además de en tejidos vasculares de hojas y tallos, también en tejidos heterotróficos, flores, raíces, silicuas y semillas (Barajas-López et al., 2007; Traverso et al., 2008).

La expresión de la fusión traduccional de los promotores de estos genes con la secuencia codificante de genes reporteros como el de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) confirmaron su expresión génica en órganos y tejidos no fotosintéticos de *A. thaliana* (Barajas-López et al., 2007).

Posteriormente, otros genes codificantes de TRXs plastidiales de *A. thaliana* fueron encontrados en estas localizaciones. Es el caso de *AtTRXy1*, que se expresa preferentemente en la raíz y en semilla (Collin et al., 2004) y *AtACHT3*, descrito en polen (Becker et al., 2003; Lee and Lee, 2003).

### **B.3.- TRXs citosólicas.**

La mayoría de las TRXs no localizadas en plastidios se engloban dentro del grupo de las TRXs tipo *h*, el más numeroso de las TRXs citosólicas. Estas proteínas se describieron en base al análisis de la estructura primaria de las proteínas que lo componen, dividiéndose en tres diferentes subgrupos, llamados I, II y III (Gelhaye et al., 2004b).

En el subgrupo I están las isoformas citosólicas *h1*, *h3*, *h4* y *h5*, las cuales difieren en el tipo de células en la que se expresan y su especificidad (Reichheld et al., 2002; Laloi et al., 2004). Así, las TRXs *h1* y *h4* tienen una expresión que se correlaciona con el ciclo celular, sugiriéndose para ellas un papel en el control redox de la proliferación celular (Menges et al., 2002). Sin embargo, la TRX *h5* parece estar específicamente involucrada en respuesta a patógenos y a estrés oxidativo (Laloi et al., 2004)

El segundo subgrupo de TRXs *h* está compuesto por aquellas que poseen una extensión N-terminal, como es el caso de las isoformas *h2*, *h7* y *h8*. Mediante inmunolocalización y marcado con GFP se ha observado que estas proteínas tienen simultáneamente localización citosólica y mitocondrial (Gelhaye et al., 2004a) por lo que esta extensión podría ser un marcador de transporte entre ambos compartimentos. Los integrantes de este subgrupo podrían desempeñar funciones comunes en ambos orgánulos, como la detoxificación de ROS.

En el tercer subgrupo de TRXs *h* se encuentran las TRXs *h9* y *h10* y dos TRXs monocisteínicas denominadas CXXS1 y CXXS2. Estas dos últimas proteínas no son consideradas como verdaderas TRXs ya que no poseen el centro activo típico de éstas, estando más relacionadas con la familia de las glutarredoxinas (GRXs) monotiólicas (Rouhier et al., 2004), si bien se incluyen al poseer sus intrones en la misma posición que las otras TRXs *h* (Meyer et al., 2002). La característica principal de este tercer subgrupo de Trxs *h* es la posible interacción de estas proteínas con el sistema GRX/GSH no siendo reducidas por el sistema reductor NTR (Juttner et al., 2000; Gelhaye et al., 2003).

Aparte de las TRXs *h*, se conocen por tener presencia en el citosol a la tetratricorredoxina (TDX) una proteína con dos dominios asociados, uno TRX en la región C-terminal y otro tipo chaperona (Höfeld et al., 1995); y la TRX-like denominada Clot (Chibani et al., 2012), la cual presenta un sitio activo redox atípico (WCDAS) y muestra homología con proteínas quinasas animales con dominio TRX (Witte et al., 2000).

A partir de los datos obtenidos por *northern-blotting*, RT-PCR semi-cuantitativa, fusiones a promotor-GUS, análisis *in silico* y transcriptómica de *A. thaliana*, han sido descritos patrones de expresión muy distintos para los 9 TRX *h* citosólicas (Reichheld et al., 2002; Belin et al., 2014).

Mientras que *AtTRXh7* se expresa específicamente en los tejidos vasculares de la raíz, *AtTRXh8* sólo lo hace en los ovarios. Otras TRXs *h* muestran una baja expresión en todos los tejidos de la planta, pero exhiben altas cantidades de transcrito en la cilindro vascular central del tallo y el polen maduro (*AtTRXh1*) o en el polen unicelular y semillas maduras (*AtTRXh4*).

En otras especies de plantas, se ha llegado a conclusiones similares en relación al patrón de expresión de genes de TRX. En guisante, se detectaron los transcritos de *PsTRXh1* en la mayoría de los órganos, con niveles más altos en hojas y flores; además usando el sistema reportero GUS se observó una expresión alta del gen en granos de polen y en los estigmas (Traverso et al., 2007).

Muchos genes codificantes de TRXs *h* también se caracterizan por una expresión específica en las semillas, en particular durante la germinación, como es el caso en guisante (Montrichard et al., 2003), y *Medicago truncatula* (Renard et al., 2011). Por otra parte, en trigo (*Triticum aestivum*), se observa la inducción de la expresión de tres genes *TaTRXh* durante la fase de desecación, mientras que de estos sólo uno, *TaTRXh1*, se expresa después de la imbibición (Cazalis et al., 2006).

En legumbres, la formación de nódulos en las raíces requiere vías de señalización específica y coordinada de la expresión de genes entre los organismos simbióticos. En soja, se ha visto que un gen *TRX h* se expresa en células de la raíz específicamente durante el proceso de nodulación y en las células infectadas (Lee et al., 2005). Por lo que se ha propuesto que esta TRX participa en la regulación de la homeostasis redox para el desarrollo de los nódulos. La asociación de las TRXs con este proceso se extendió posteriormente al aislar dos nuevas TRXs específicas en legumbres denominadas *TRXs s* (Alkhalfioui et al., 2008), relacionándolas con la interacción simbiótica.

#### **B.4.- TRXs mitocondriales.**

El número y variedad de TRXs en las mitocondrias es mucho más reducida que en plastidios. Solo se conocen dos tipos (*o1* y *o2*) en *A. thaliana*. La TRX *o1* posee un péptido señal en su extremo N-terminal relacionado con el transporte de la proteína a la mitocondria, encontrándose de forma específica en este compartimento. Mientras que la TRX *o2*, su parólogo, se expresa a un nivel muy bajo y su localización subcelular aún no se ha establecido claramente (Laloi et al., 2001).

La búsqueda de dianas para TRX *o1* mediante cromatografía de afinidad (Yoshida et al., 2013) reveló su interacción con al menos 101 proteínas mitocondriales, las cuales poseían funciones relacionadas con la cadena respiratoria, la fotorrespiración, el metabolismo de aminoácidos, la biosíntesis del cluster Fe-S, el transporte de membrana y el sistema antioxidante. Además, recientes estudios han confirmado que su posible rol como regulador central de enzimas clave del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Daloso et al., 2015)

Excepcionalmente se ha comprobado que la PtTRX *h2* de álamo, se encuentra en mitocondria, a pesar de la ausencia de un péptido de tránsito mitocondrial típico (Gelhaye et al., 2004a). Sin embargo, su ortólogo en *A. thaliana*, la AtTRX *h2*, se localiza tanto en el citosol como en la mitocondria (Meng et al., 2010).

### **B.5.- Nucleorredoxinas.**

Las nucleorredoxinas (NRXs) conocidas en vegetales están compuestas de dos o tres dominios TRX asociados a motivos putativos de localización nuclear y que no muestran una homología con las NRXs de mamíferos (Funato et al., 2006). Se puede destacar que el ortólogo de AtNRX1 en *Zea mays* tiene una localización tanto citosólica como nuclear (Laughner et al., 1998).

## **C.- TRXs plastidiales.**

### **C.1.- Sistemas de reducción.**

Las TRXs plastidiales son reducidas generalmente por la enzima ferredoxín tiorredoxín reductasa (FTR) a través de un mecanismo dependiente de la luz (Schürmann and Buchanan, 2008). La FTR es una enzima que solo ha sido descrita en plástidos de plantas y cianobacterias, en el que desarrolla un papel fisiológico muy importante al convertir la señal de electrones procedentes del Fotosistema I (PSI) y transmitida por la Ferredoxina (Fd) en una cascada tiol reductora (Dai et al., 2000) (Figura 4).

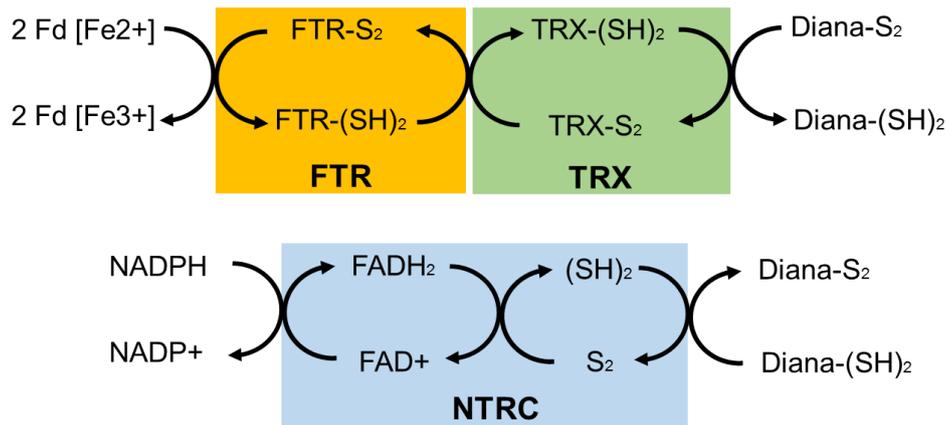


Figura 4.- Representación esquemática de los sistemas de reducción de TRXs plastidiales FTR (arriba) y NTRC (abajo).

En *A. thaliana* la FTR se encuentra compuesta de dos subunidades: un péptido catalítico que contiene un cluster [4Fe-4S], codificado por un gen único, asociado con un péptido variable, este codificado por dos genes (Xu et al., 2009; Chibani et al., 2010). Estos genes pueden expresarse en tejidos heterotróficos en determinados procesos fisiológicos, (Barajas-López et al., 2007; Traverso et al., 2008; Watkinson et al., 2008).

En *A. thaliana*, hay cuatro genes que codifican las Fds (Hanke et al., 2004), de los cuales las isoformas AtFd1 y AtFd2 son las que se expresan de forma más abundante en hojas y son las responsables de la reducción de la FTR y por tanto de las TRXs en los cloroplastos.

Por otro lado la Fd también tiene la capacidad de reducir a la ferredoxín NADP<sup>+</sup> reductasa (FNR), enzima que cataliza la reducción de NADP a NADPH fuente de poder reductor de otras tiol reductasas, como es el caso de la NTRC. Se ha comprobado que la inactivación del gen AtFd2 afecta a la fotosíntesis y el crecimiento pero no es letal (Voss et al., 2008).

El mutante de *A. thaliana* defectivo en la subunidad variable DYLL15 de la FTR resultó ser significativamente más sensible al estrés oxidativo (luz de alta intensidad y paraquat) y presentaba poca disminución de la actividad en NADP<sup>+</sup>-MDH (Keryer et al., 2004), probablemente debido a la compensación por el segundo gen que codifica la subunidad variable de la FTR. Paralelamente, la

inactivación inducida por silenciamiento génico de la subunidad catalítica de FTR en tomate, no afecta a la morfología ni al tamaño de la planta, al menos en la etapa temprana de desarrollo. Sin embargo, aparecen lesiones necróticas en las hojas y se observa que varias proteínas de defensa están sobreexpresadas, y que hay una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un subproducto de la fotosíntesis (Lim et al., 2010). Esto sugiere que la actividad antioxidante de las TRXs plastidiales es particularmente importante a pesar de la presencia de otros sistemas antioxidantes FTR independientes, como la NTRC. La reducción de la mayoría de las TRXs plastidiales por el sistemas FTR ha sido bien documentada (Schürmann and Buchanan, 2008; Bohrer et al., 2012).

Si bien el mecanismo descrito para la FTR es la vía de reducción de las TRXs plastidiales mejor conocida, se han descrito otros modos alternativos:

- Varios tipos de TRXs plastidiales se puede también reducir *in vitro* por la acción de la NTR. Esta proteína homodimérica y asociada a una flavina, se encuentra implicada principalmente en la reducción de TRXs citosólicas (Jacquot et al., 1994) y mitocondriales (Laloi et al., 2001). Además del hipotético papel de la NTRC como activador redox alternativo en condiciones de oscuridad y/o en órganos no fotosintéticos, es factible que las TRXs plastidiales expresadas en órganos no fotosintéticos sean activadas por las isoformas FNR (Hanke et al., 2004; Barajas-López et al., 2007; Bohrer et al., 2012). En *A. thaliana*, se conocen también que los genes *NTRA* y *NTRB* codifican, según el procesamiento post-transcripcional, para una enzima citosólica o una proteína mitocondrial respectivamente (Reichheld et al., 2005).
- La NTRC es una enzima catalogada en apartados anteriores como TRX-*like*, que posee actividad TRX reductasa dependiente de NADPH (Figura 4) y descrita hasta el momento en plastidios de organismos fotosintéticos oxigénicos. En un principio se pensó que era ineficiente en el proceso de reducción de TRXs libres en el cloroplasto (Pérez-Ruiz et al., 2006; Bohrer et al., 2012), pero ensayos con líneas de *A. thaliana* expresoras de NTRC con el dominio TRX inactivo han sugerido que su capacidad de donar electrones a TRXs plastidiales era considerablemente efectiva (Toivola et al., 2013). La NTRC ha demostrado ser un regulador redox fundamental en el cloroplasto y

en los plastidios no fotosintéticos (Pérez-Ruiz et al., 2006; Lepistö et al., 2009; Kirchsteiger et al., 2012). Líneas deficientes en la expresión de NTRC (*ntrc*) con el fenotipo muy afectado, mostraron que su función no es redundante con la de la FTR (Pérez-Ruiz et al., 2006; Lepistö et al., 2009). La isoforma de *A. thaliana* debido a su estructura de superficie no es reducible por FTR pero si por DTT y por otras TRXs plastidiales (Bohrer et al., 2012; Toivola et al., 2013) (Figura 5), al igual que se ha descrito para la reducción de la CcdA (Motohashi and Hisabori, 2010). No obstante, ensayos bioquímicos con TRX de álamo han demostrado que esta proteína también puede ser reducida por la NTRB (Chibani et al., 2010), dato que se suma al hecho fisiológicamente importante de que esta proteína se expresa tanto en plastidios como en el citosol (Rivas et al., 2004).

- Ciertas TRXs-*like* pertenecientes a la familia ACTH pueden ser reducidas por GSH de una manera análoga a las GRXs (Chibani et al., 2012).
- Como se ha descrito en apartados anteriores, el descubrimiento de las TRXs plastidiales en tejidos heterotróficos (Barajas-López et al., 2007; Traverso et al., 2008) indicó la posibilidad de que éstas puedan ser reducidas mediante un mecanismo no dependiente de los electrones derivados de los fotosistemas. En plastidios no fotosintéticos que contienen el sistema Fd/FTR (Balmer et al., 2006a), los azúcares generados en los cloroplastos y transportados a través del floema (Figura 5), al ser degradados por la vía oxidativa de las pentosas fosfato (OPP), generan poder reductor en forma de NADPH que son utilizados en reducción de FNR (Geigenberger et al., 2005; Michalska et al., 2009). De tal forma que, a través del sistema Fd/FTR, la FNR es capaz de reducir las TRXs. De esta forma las plantas pueden ajustar los procesos heterotróficos en los tejidos sumidero con el poder reductor procedente de la fotosíntesis en tejidos verdes.
- Aunque el metabolismo del cloroplasto es altamente dependiente de la luz, el mecanismo reductor mencionado en el anterior punto puede ocurrir en cloroplastos fotosintéticos bajo condiciones de oscuridad (Figura 5) usando como fuente de poder reductor el NADPH estromático derivado de degradación de los hidratos de carbono por la vía OPP.

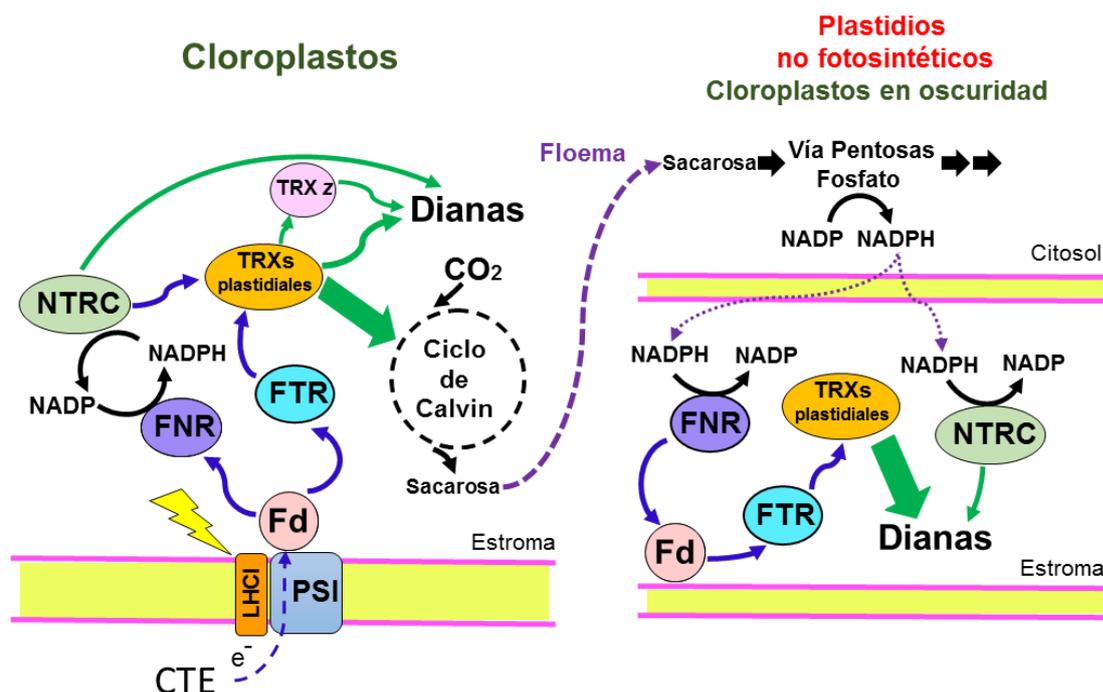


Figura 5.- Representación esquemática de los sistemas de reducción de TRXs en cloroplastos (izquierda) y plastidios no fotosintéticos (derecha). En el cloroplasto, la FTR reduce por un lado a las TRXs plastidiales con el poder reductor proporcionado por la Cadena de Transporte Electrónico (CTE) a través de la ferredoxina (Fd) y por otro a la NTRC que a su vez puede reducir alternativamente a las propias TRXs. Las TRXs situadas en plastidios no fotosintéticos son reducidas por el sistema FNR/Fd/FTR usando el poder reductor (NADPH) generado por la vía oxidativa de las pentosas fosfato en el citosol, el cual tiene como precursores metabólicos a los azúcares solubles sintetizados en cloroplastos.

## C.2.- Dianas moleculares.

### C.2.1.- Dianas clásicas.

En cloroplastos, la reducción catalizada por las TRXs induce un cambio conformacional que puede activar o inhibir las actividades enzimáticas de las proteínas diana (Buchanan et al., 2005; Schürmann and Buchanan, 2008).

Muchas de las enzimas que pertenecen a las rutas biosintéticas plastidiales son activadas por mecanismos de reducción catalizados por TRXs en presencia de luz. En este grupo se encuentran varias enzimas del ciclo de Calvin como la cFBP1, la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (SBPasa), la fosforribuloquinasa (PRK) y la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Schürmann et al., 1976; Wolosiuk and Buchanan, 1977, 1978; Buchanan, 1980; Schürmann and Buchanan, 2008); además de enzimas pertenecientes a otras importantes vías metabólicas como la  $NADP^+$ -MDH (Jacquot et al., 1976; Wolosiuk et al., 1977; Vidal et al., 1978; Scheibe and Anderson, 1981), la subunidad c de la ATP sintasa

(McKinney et al., 1978; Mills and Mitchell, 1982), la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) (Sasaki et al., 1997), la RUBISCO activasa (Zhang and Portis, 1999) y la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) (Ballicora et al., 2000).

Por el contrario, otras proteínas son desactivadas por las TRXs en condiciones luminosas, y activadas en oscuridad, siendo un ejemplo bien conocido la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) enzima que juega un papel clave en la vía OPP, proceso metabólico que se inhibe durante el día (Schürmann and Buchanan, 2008; Née et al., 2009).

La explicación a este comportamiento dual de activación/desactivación viene explicado por el hecho de que, en condiciones de oscuridad, al no existir radiación luminosa se interrumpe el transporte de electrones desde los fotosistemas hacia las TRXs del cloroplasto, y se oxidan. Bajo estas condiciones, las TRXs por un lado dejan de ser activas con respecto a sus funciones biosintéticas, y por otro cesan de inhibir a enzimas que actúan en la fase nocturna, como es el caso de la G6PDH. La reacción catalizada por esta enzima genera NADPH, implicada entre otros ejemplos en el proceso de reducción de la FNR como se detalló en el apartado anterior. De esta forma las TRXs aseguran su función de acuerdo con las necesidades del cloroplasto a lo largo del fotoperiodo.

#### C.2.2.- Dianas encontradas mediante técnicas de proteómica.

Para avanzar en el entendimiento de los roles bioquímicos y fisiológicos de las TRXs vegetales, desde hace varias décadas se comenzaron a emplear en la búsqueda de dianas moleculares técnicas de proteómica, basadas principalmente en la captura por afinidad utilizando formas mutantes de las TRX, el marcado de grupos tiol utilizando sondas fluorescentes o radiactivas, y la co-inmunoprecipitación (Montrichard et al., 2009).

Estos estudios han conseguido que hasta la fecha se haya alcanzado identificar un número aproximado de 400 proteínas dianas potenciales para las TRXs en células vegetales (Lemaire et al., 2007; Schürmann and Buchanan, 2008; Montrichard et al., 2009; Lindahl et al., 2011), si bien la posible regulación redox de la mayoría de ellas aún necesita verificación experimental.

Mediante el empleo de la técnica de marcado fluorescente con monobromobimano (mBB) combinada con electroforesis bidimensional, 49 proteínas disulfuro fueron identificadas en distintas fracciones cloroplastídicas de *A. thaliana* (Ströher and Dietz, 2008). Sin embargo ha sido la cromatografía de afinidad utilizando TRXs monocisteínicas como ligandos, la que ha jugado un papel clave en el descubrimiento de nuevas dianas, elevando el número de éstas a aproximadamente 100 (Motohashi et al., 2001; Balmer et al., 2003; Balmer et al., 2004; Motohashi and Hisabori, 2006; Bartsch et al., 2008; Hall et al., 2010).

Si bien el hecho de que gran parte de las TRXs plastidiales conocidas hayan sido descritas en el estroma (Cain et al., 2009) indica que el número de proteínas diana en esta localización debe ser considerablemente grande, diferentes líneas de investigación han sugerido igualmente la presencia de estas en la membrana cloroplastídica, el lumen y en la membrana tilacoidal (Marchand et al., 2004; Balmer et al., 2006b; Marchand et al., 2006; Motohashi and Hisabori, 2006; Bartsch et al., 2008).

- Estroma.

Diversos estudios de cromatografía de afinidad que usaron TRXs *f* y *m* (tanto en sus estados nativos como en formas mutadas) como cebos en la búsqueda de nuevas dianas presentes en el estroma, revelaron que el control mediado por las TRXs es una característica de muchas vías metabólicas y procesos celulares acontecidos en los cloroplastos.

Así, el control redox tiol/disulfuro parece regular a otros componentes, del ciclo de Calvin además de las dianas clásicas (como la fosfogliceroquinasa, la fosfato triosa isomerasa y la transcetolasa), de la biosíntesis de tetrapirroles, vitaminas y de Cys, y de las vías de asimilación de azufre y nitrógeno (Motohashi et al., 2001; Balmer et al., 2003; Dominguez-Solis et al., 2008).

A nivel celular, las TRXs plastidiales están implicadas en la modulación de la transcripción, la traducción, el plegamiento de proteínas y la respuesta al estrés oxidativo (Motohashi et al., 2001; Balmer et al., 2004; Marchand et al., 2004; Rey et al., 2005; Marchand et al., 2006). Dentro de esta última función es preciso destacar el rol como dianas de las TRXs de ciertas reductasas con función

antioxidante y detoxificante, tales como la glutatión peroxidasa (GPX), las metionina sulfóxido reductasas A y B (MSRA/MSRB) y las peroxirredoxinas (PRXs) de tipo 2-cys, PRX Q y PRX II (Baier and Dietz, 1997; Lemaire et al., 2004; Marchand et al., 2004; Rey et al., 2005; Lamkemeyer et al., 2006; Vieira et al., 2007; Gama et al., 2008). Mediante ensayos de doble híbrido en levadura (Y2H), se comprobó que la NTRC también es capaz de reducir a la 2-cys PRXs en cloroplastos, proporcionando de esta manera una respuesta de defensa antioxidante tanto bajo condiciones de luz como de oscuridad (Moon et al., 2006; Pérez-Ruiz et al., 2006).

- Membrana cloroplastídica.

La subunidad Tic55, perteneciente al sistema de transporte de la membrana interna cloroplastídica (Tic) e implicada en el transporte de proteínas desde el citosol al estroma del cloroplasto, fue de las primeras proteínas presentes en membrana cloroplastídica identificadas como un objetivo potencial de las TRXs plastidiales (Bartsch et al., 2008). Posteriormente se determinó que Tic110, una proteína transmembrana componente de este mismo sistema, presentaba un puente de disulfuro en su cara estromática capaz de ser reducido *in vitro* (Balsera et al., 2009). Igualmente, se ha comprobado que son susceptibles de reducción por TRXs la proteína del translocon pPORA, denominada PTC52, y la feofórbido A oxigenasa (Bartsch et al., 2008).

Estas 4 dianas sugieren que el proceso de importación de proteínas desde el citosol al estroma es dependiente del control redox ejercido por TRXs. No obstante, este número es bajo si consideramos que alrededor de 700 proteínas se han identificado en la membrana de los cloroplastos de *A. thaliana* (Ferro et al., 2010), por lo que es probable que sean muchas más las dianas presentes en la membrana del cloroplasto que aún no se han identificado.

- Membrana tilacoidal.

La identificación de dianas presentes en la membrana tilacoidal utilizando la técnica de marcado con mBBR combinada con electroforesis bidimensional (Balmer et al., 2006b) ha sido utilizando a pesar de que la hidrofobicidad de las proteínas de la membrana limita este enfoque en su mayor parte a la detección

de proteínas solubles periféricas de membrana. A pesar de ello, entre las dianas de TRXs descritas en esta región también se incluyen las proteínas intrínsecas de membrana tales como la LHCIIb y la subunidad PsaK del PSI (Balmer et al., 2006b). Otras dianas implicadas en procesos relacionados con la membrana tilacoidal son los complejos de recolección de luz (LHC, *light-harvesting complex*, LHC) (Rintamäki et al., 2000), la quelatasa de Mg que cataliza un paso temprano en la biosíntesis de la clorofila (Ikegami et al., 2007; Kobayashi et al., 2008) y el complejo citocromo  $b_6f$  (Lennartz et al., 2001).

- Lumen tilacoidal.

La presencia de dianas de las TRXs en el lumen tilacoidal en principio no parecía posible, ya que las condiciones de pH y el ambiente oxidante que generan el transporte fotosintético de electrones, no favorecen la transmisión de señales redox dependientes de la formación de un anión tiolato en el sitio activo. No obstante, poco después de iniciarse su descripción en el estroma se identificaron mediante cromatografía de afinidad varias dianas de las TRXs plastidiales presentes en el lumen. Es el caso de la anteriormente mencionada PRXQ de *A. thaliana* (Kieselbach and Schröder, 2003; Petersson et al., 2006) y las subunidades lumenales O2, P1 y Q del complejo de fotólisis del agua PsbO (Marchand et al., 2006; Ströher and Dietz, 2008; Lindahl and Kieselbach, 2009).

Así mismo, se ha comprobado que otras 19 proteínas del lumen de *A. thaliana*, y que representan más del 40% del proteoma asociado a este compartimento, pueden ser reducidas por TRXs *in vitro* (Hall et al., 2010). Esto hace del lumen el compartimento del cloroplasto con el mayor número de dianas potenciales de las TRXs conocido hasta ahora.

Mientras que las funciones de la mayoría de las dianas aún no han sido descritas, algunas de las interacciones entre TRXs y las proteínas del lumen indican que tienen un papel en la regulación del ciclo redox xantofila, y un papel decisivo en la degradación del PS II (Hall et al., 2010). Así mismo, un homólogo de la DsbA/B-oxidorreductasa como el encontrado en las cianobacterias (Singh et al., 2008) podría estar involucrado en el plegamiento oxidativo de proteínas presentes en el lumen.

Se desconocen de forma detallada las vías que conducen a la reducción de las dianas del lumen, si bien se ha sugerido que la TRXs-*like* Hcf164 en asociación con CcdA, podrían intervenir en el proceso (Page et al., 2004; Motohashi and Hisabori, 2006). Ambas proteínas, presentes en la membrana tilacoidal, podrían intervenir en una cascada de transporte redox de equivalentes reductores a través del intercambio de disulfuro/ditiol desde el estroma del cloroplasto al lumen de los tilacoides, ya que se sabe que CcdA es diana de las TRXs de tipo *m* (Motohashi and Hisabori, 2010).

- Plastidios no fotosintéticos.

La regulación de enzimas por TRXs en plástidos de tejidos no verdes (heterótrofos) es un mecanismo de descubrimiento relativamente recientemente y no ha sido analizado en detalle, por lo que su estudio se ha restringido hasta el momento a los amiloplastos, orgánulos especializados en la producción de almidón. Así, combinando las técnicas de marcado fluorescente con mBBR y de cromatografía de afinidad se han detectado en estos plastidios 42 potenciales dianas de TRXs, entre cuyas funciones se incluyen la síntesis y degradación de azúcares y almidón, el metabolismo de aminoácidos, la biosíntesis de lípidos y el plegamiento de proteínas.

Estos hallazgos sugieren que las TRXs podrían controlar las principales vías metabólicas de los amiloplastos (Balmer et al., 2006a) destacándose la AGPasa, enzima clave en la síntesis de almidón, cuya regulación redox a través de la NTRC se ha demostrado *in vivo*, tanto en amiloplastos como en cloroplastos (Michalska et al., 2009). Así mismo, también se sabe que la degradación del almidón que tiene lugar durante la germinación de las semillas también está regulada por TRX en plastidios mediante el control de la  $\beta$  amilasa 1, BAM1 (Sparla et al., 2006).

Por último, la raíz es uno de los órganos no fotosintético dónde ha sido encontrada la presencia de dianas de las TRXs plastidiales. Mediante cromatografía de afinidad, y usando como cebo una forma mutante de TRX  $\gamma$ 2 incapaz de constituir puentes disulfuro, se detectaron hasta 72 dianas potenciales (Marchand et al., 2010) relacionadas con diferentes procesos celulares como la

biosíntesis de aminoácidos y ácidos grasos, la formación de la pared celular, la biosíntesis de isoprenoides y fenilpropanoides, la transducción de señales, la desintoxicación y la defensa.

### C.3.- Mecanismos de regulación redox de las dianas.

La regulación redox ejercida por las TRXs, mediante intercambio de los estados tiol/disulfuro de las Cys presentes en el sitio activo de las proteínas diana, puede implicar bien un sistema binario de activación/desactivación o bien una modulación gradual de la actividad. Estos mecanismos han sido estudiados mediante ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*, y métodos que usan la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (FRET) para obtener imágenes de la interacción entre proteínas (Seidel et al., 2010) y se pueden clasificar en cuatro tipos (Figura 6).

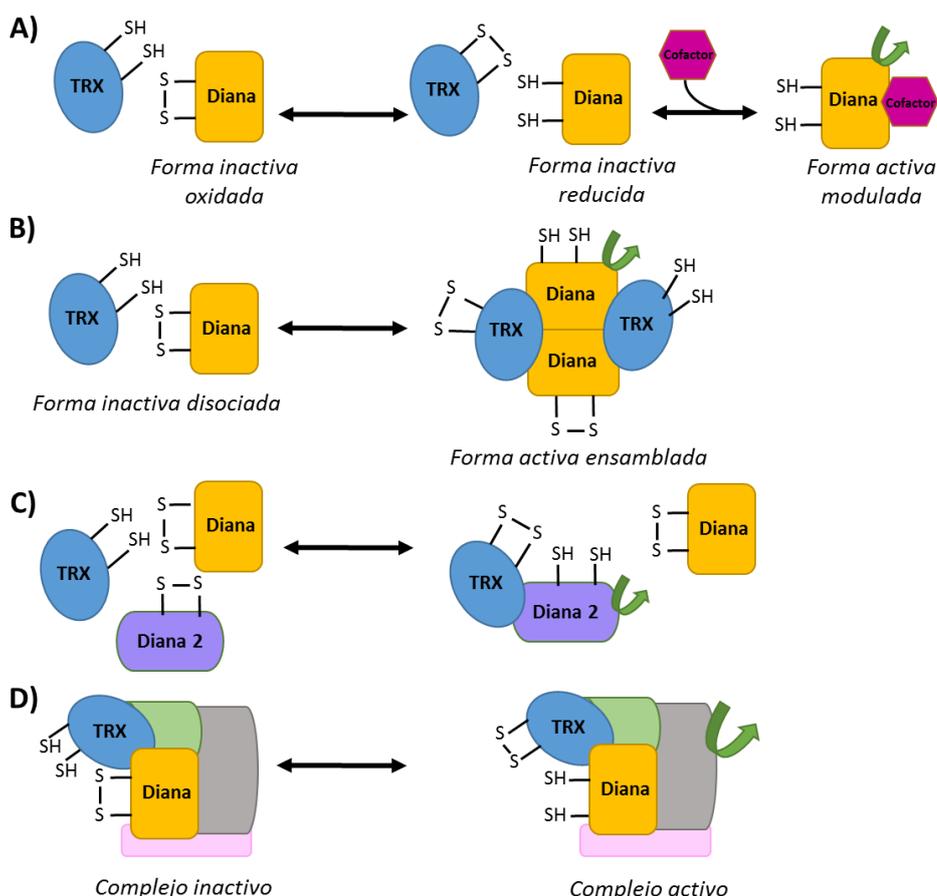


Figura 6.- Mecanismos de regulación redox tiol/disulfuro en plastidios. Los esquemas presentan cuatro mecanismos de regulación tiol/disulfuro como se explica en el texto: A) interacciones redox transitorias de corta duración, B) formación transitoria de complejos entre elementos de red, C) competición entre múltiples dianas y D) formación constitutiva de complejos.

### C.3.1.- Interacciones redox de corta duración y modulación dependiente de cofactores.

La conversión desde la forma reducida a la oxidada, a través de la acción de las TRXs, altera la conformación y la actividad de las proteínas diana. Este mecanismo se basa a menudo no sólo en el cambio redox sino que además implica cofactores, tales como metabolitos, para permitir el intercambio redox o para traducir el cambio redox en las respuestas metabólicas apropiadas (Figura 6A). Ejemplos bien conocidos son dependientes de NADP<sup>+</sup>-MDH y la cFBP1. Así, la activación mediante reducción de estas enzimas solo se produce cuando existen altos cocientes de NADPH/NADP y Ca<sup>2+</sup>/FBP (fructosa-1,6-bisfosfato) respectivamente (Scheibe and Jacquot, 1983; Faske et al., 1995). A través de este mecanismo de interacción de corta duración las TRXs no solo regulan el metabolismo, sino también la transcripción y la traducción.

### C.3.2.- Formación transitoria de complejos redox.

Los estudios de cromatografía de afinidad que usaron como cebo a TRXs en su estado nativo encontraron posibles dianas, con las que podría unir a través de una interacción no redox (Balmer et al., 2004). Se sugiere que las interacciones no iónicas facilitan la transferencia de electrones desde el PS I a las proteínas diana. Paralelamente, la activación redox tiol/disulfuro entre factores de ensamblado de proteínas estructurales pueden generar la conformación adecuada que facilita la formación de complejos (Figura 6B).

Un ejemplo interesante es la regulación redox por las TRXs plastidiales del factor de elongación Tu que cataliza el transporte de ARNt en el proceso de traducción. Transitoriamente este factor se asocia con ribosomas activos, y en varias ocasiones ha sido identificada su interacción con TRXs, al igual que los factores de alargamiento EF-1, EF-1b, y EF-2 (Buchanan and Balmer, 2005).

### C.3.3.- Competición por cantidades limitadas y no estequiométricas de proteínas diana.

El funcionamiento del sistema redox tiol/disulfuro también depende de la relación existente entre la concentración de dianas oxidadas y la de TRXs reducidas disponibles, de manera que desequilibrios estequiométricos alteran el flujo de electrones y la cinética de activación en la red redox (Figura 6C). Un

ejemplo de este tipo de regulación es de las proteínas dianas 2-Cys PRX A y B las cuales están en una concentración aproximada de 60-80  $\mu\text{mol/L}$  en el estroma (König et al., 2002; Peltier et al., 2006) mientras que las concentraciones de la SBPasa y NADP<sup>+</sup>-MDH son 14  $\mu\text{mol/l}$  y 3  $\mu\text{mol/l}$  respectivamente; la TRX *f1*, TRX *m1* y la TRX *x* tienen una concentración estimada de entre 0,01 a 0,1  $\mu\text{mol/l}$  (Peltier et al., 2006). Por otra parte se puede añadir otro nivel de complejidad en este mecanismo, aportado por la localización múltiple de las proteínas dianas en distintos órganos y tejidos, que evidencia funciones de las TRXs extraplásticas. Es por ejemplo el caso de la TRX *m3*, la cual fue localizada tanto en plastidios de tejidos no verdes, como en los meristemas y tejidos sumidero en desarrollo (Benitez-Alfonso et al., 2009).

#### C.3.4.- Unión permanente en complejos multiproteicos.

Las proteínas diana de las TRXs pueden ser componentes permanentes de complejos y estructuras funcionales, como es el caso de las proteínas ribosomales (Figura 6D). Los polipéptidos diana son capaces de cambiar o modular la actividad del complejo cuando interactúan con las TRXs y se produce el intercambio redox tiol/disulfuro (Buchanan and Balmer, 2005). Así ocurre durante la activación de la ATP sintasa cloroplástica a través de la reducción de un puente disulfuro en la subunidad  $\gamma$  (Schwarz et al., 1997); o el proceso del sistema plastidial de importación de precursores peptídicos que contiene a la TIC110, proteína modulada vía redox posiblemente por TRXs localizadas en el estroma (Balsera et al., 2009).

### **C.4.- Funciones bioquímicas y fisiológicas.**

#### C.4.1.- Regulación redox de la fotosíntesis.

Las TRXs plastidiales tipo *f* y *m* fueron las primeras TRXs de plantas en ser caracterizadas cuando las investigaciones bioquímicas *in vitro* revelaron que regulan, en una manera dependiente de la luz, la actividad de enzimas que participan en la fotosíntesis (Jacquot et al., 1978) y del carbono (Collin et al., 2003). Una excepción notable es la TRX *m3* que muestra sólo propiedades de activación pobres hacia estas enzimas.

Para poder determinar *in vivo*, si existe diferencias de especificidad funcional y/o redundancia entre las distintas isoformas de las TRXs *f* y *m* se han utilizado mutantes de *A. thaliana* con pérdida de función (simples, dobles o incluso triples) por silenciamiento causado mediante inducción viral (VIGS) o por inserción de ADN transferente (ADNt). No obstante, esta estrategia no siempre conduce a los resultados esperados, debido a las funciones cruzadas con la familia GRX que algunos autores han evidenciado mediante la inhibición de la síntesis de GSH (Reichheld et al., 2007).

En plantas de guisante, el silenciamiento de *PsTRXf* no da lugar a un cambio notable en el crecimiento y el desarrollo de la planta, pero el silenciamiento simultáneo de los genes *PsTRXs f* y *m* resulta en un fenotipo con hojas de color verde pálido, alteraciones en la homeostasis redox y una fotosíntesis deficiente (Luo et al., 2012). Este fenotipo se ha atribuido, al menos en parte, a defectos en la ruta de biosíntesis de la clorofila debido a una alteración en la regulación redox de la subunidad quelatasa magnesio CHLI. Curiosamente, las plantas de *Nicotiana tabacum* sobreexpresoras de *NtTRXm*, a diferencia de plantas sobreexpresoras de *NtTRXf*, exhiben un crecimiento reducido, un menor contenido de clorofila y alteraciones en el contenido de glutatión y ascorbato (Rey et al., 2013).

El silenciamiento simultáneo de los genes *AtTRX m1*, *m2* y *m4* en *A. thaliana* también causó una reducción del crecimiento vegetal, un color verde pálido en las hojas y niveles elevados de ROS (Wang et al., 2013). Además se determinó que el núcleo estructural del PSII en estas plantas mutantes presentaba un estado redox alterado.

Este dato concuerda con el hecho de que han sido identificados como dianas de las TRXs *f* y *m* un gran número de proteínas implicadas en la formación de los complejos recolectores de luz, en ciertos casos con una regulación circadiana (Harmer et al., 2000). Destacan entre ellas los complejos recolectores de luz LHCA y LHCB y varias proteínas de los centros de reacción del PSI y PSII (Montrichard et al., 2009). Basándose en estos datos, se ha propuesto que estas tres *AtTRXs m* participan en la biogénesis del PSII, controlando la formación de complejos fotosintéticos (Figura 7).



La NTRC también ha sido implicada en la reducción de dianas relacionadas con procesos de biogénesis de los cloroplastos, la biosíntesis de clorofilas, antocianinas y aminoácidos aromáticos (Lepistö et al., 2009; Lepistö et al., 2012; Richter et al., 2013). Además, recientemente se ha descrito la existencia de una redundancia funcional entre esta proteína y la TRX *f1* en la regulación del metabolismo fotosintético y del crecimiento de las plantas en respuesta en diferentes condiciones de luz (Geigenberger et al., 2005).

El análisis de los parámetros fotosintéticos de un mutante de pérdida de función de *A. thaliana* ha permitido descubrir una forma de control directa de la fotosíntesis, llevada a cabo por la TRX *m4* (Courteille et al., 2013). Esta isoforma podría desempeñar un papel importante en cloroplastos regulando las vías alternativas de transmisión de electrones fotosintéticos en *A. thaliana* y de *N. tabacum*, reprimiendo el flujo cíclico de electrones (CEF) que participa en el mantenimiento de un equilibrio adecuado ATP/NADPH (Figura 7). Aunque esta fue la primera función específica asignada a TRX *m4*, la importancia fisiológica de este tipo de regulación aún queda por aclarar. El papel de las TRXs *m* en la regulación de la fotosíntesis también se ha podido comprobar mediante la represión de los niveles de OsTRX *m* en arroz. En estos mutantes se producía una disminución de la eficiencia fotosintética bajo tratamientos de alta irradiación, junto con cambios ultraestructurales en tilacoidales y un contenido reducido en clorofila y otros pigmentos que causan el color verde pálido en hojas (Chi et al., 2008).

Dada la estrecha relación bioquímica entre la fotosíntesis y la fijación de carbono y el hecho bien conocido de que el metabolismo del carbono está bajo el control del circadiano parece razonable sugerir que los genes codificantes de las TRXs plastidiales deban tener una regulación transcripcional similar con el fin de optimizar estos procesos fisiológicos. Sin embargo, en el caso de *A. thaliana* sólo dos de las seis isoformas *f* y *m* existentes (TRX *f2* y TRX *m2*) siguen un ritmo circadiano, mientras que en el del guisante se ha observado esta regulación en las TRXs de *f* y *m1* (Barajas-Lopez et al., 2011). Las demás isoformas de las TRXs son inducidas directamente por la luz, a excepción de la TRX *m3*, isoforma que

podría estar bajo una regulación más compleja debido a su distinta especificidad funcional (Benitez-Alfonso et al., 2009).

En cuanto a la regulación de la fotosíntesis, se ha visto que bajo altas intensidades de luz tanto las TRXs *f* como las *m* son capaces de inactivar *in vivo* a la Ser-Thr quinasa STN7 (Figura 7), enzima asociada al citocromo *b<sub>6</sub>f* e implicada en el proceso de distribución de los LHC en la membrana tilacoidal, controlando así la asociación de estos con los fotosistemas PSI y PSII (Rintamäki et al., 2000).

Recientemente, se determinó que las TRXs *m* y *f* son capaces de transferir equivalentes de reducción a la HCF164, si bien las isoformas de tipo *m* lo hacen de manera más eficiente (Figura 7). Esta enzima participa en la biogénesis del citocromo *b<sub>6</sub>f* (Lennartz et al., 2001), en el transporte de electrones entre PSI y PSII y en la reducción de la subunidad N del PSI (PSAN), tanto *in vitro* como en tilacoides aislados (Motohashi and Hisabori, 2006). Como se comentó en apartados anteriores la reducción de la HCF164 podría implicar a la CcdA (Motohashi and Hisabori, 2010) en base a los resultados indirectos obtenidos de experimentos subcelulares *in vitro* y similitudes fenotípicas entre los mutantes defectivos de *A. thaliana* denominados *ccda* y *hcf164* (Page et al., 2004). Estos fenotipos se originan a partir de la interrupción de la fotosíntesis y por problemas en la maduración del citocromo *b<sub>6</sub>f* como indican los altos niveles de fluorescencia determinados. Se ha propuesto que *AtHCF164* y *AtCCDA* participan en la entrega de poder reductor para mantener a las Cys del apocitocromo (precursor del citocromo) en un estado reducido antes de la unión de grupos hemo (Page et al., 2004). Otra TRX-*like* de membrana, la LTO1 ha sido implicada en la reducción de la subunidad presente en el lumen denominada PsbO, siendo requerida para el ensamblado del PSII (Karamoko et al., 2011). Su ausencia induce un fenotipo atrofiado indicando una función importante en cloroplasto.

### C.4.2.- Control del metabolismo de carbohidratos en los plástidios.

Los azúcares son moléculas producidas como resultado del proceso fotosintético. Junto con el contenido de grupos tiol en hojas, son uno de los factores que regulan la expresión de genes y proteínas de *PsTRXf* y *m1* en plantas de guisante (Barajas-Lopez et al., 2012). Esta regulación se ejerce principalmente

por glucosa y sacarosa probablemente a través del factor de transcripción PsDOF7, capaz de unirse a un motivo DOF de guisante presente en los promotores de *PsTRX f* y *m1* (Barajas-Lopez et al., 2012).

La regulación redox ejercida por las TRXs *f* y *m* sobre enzimas del ciclo de Calvin es de las mejores caracterizadas *in vitro* (Lindahl and Kieselbach, 2009; Meyer et al., 2012) especialmente la activación de la cFBP1 por TRX *f* (Jacquot et al., 1995; Jaramillo et al., 1997; Cazalis et al., 2004). Recientemente este rol ha sido ampliado *in vitro* mediante ensayos con las formas recombinantes purificadas de las TRXs *f*, *m*, *x* e *y* de *A. thaliana* (Yoshida et al., 2015). De todas las isoformas estudiadas, solo las TRXs *f1* y TRX *f2* mostraron que podían inducir la conversión de la cFBP1 y la SBPasa desde un estado oxidado a su forma reducida. Las TRX *m2* y TRX *m4* también presentaron capacidad para la reducción de la SBPasa, pero con una eficiencia sensiblemente menor a la de las isoformas de tipo *f*. Interesante fue comprobar que *in vivo*, la fotorreducción de la FBPasa solo estuvo parcialmente afectada en plantas deficientes en AtTRX *f1* y en AtTRX *f2* (Yoshida et al., 2015) y no en el mismo grado que muestran los datos *in vitro*.

Experimentos de inmunolocalización en cloroplastos de guisante han mostrado que las TRXs *f* y *m* no presentan una distribución al azar si se compara con enzimas del ciclo de Calvin tales como la NADP<sup>+</sup>-MDH, la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) y la ATP sintasa (Anderson et al., 2008). Basándose en estudios de co-localización de TRXs plastidiales con enzimas no activadas por luz, se ha propuesto una función secundaria para las TRXs plastidiales como elementos que facilitan las interacciones entre enzimas y/o la unión de sustratos y cofactores. En base a esto se ha propuesto que los mecanismos mediante los cuales las TRXs plastidiales ejercen una modulación de las actividades enzimáticas no sólo implican un simple mecanismo de encendido/apagado, como se explicó en el apartado C.3, sino también interacciones de corta duración (König et al., 2012).

Por otro lado ha sido descrito un modo de activación indirecto que implica a la CP12, una pequeña proteína cloroplastídica que contiene cuatro Cys con actividad redox (Wedel et al., 1997). En su estado oxidado, la CP12 forma un complejo inactivo (Figura 7) con la GAPDH y la PRK, el cual se restaura

completamente después de la reducción mediada por la TRX *f* (Marri et al., 2009). Los estudios *in vivo* además han puesto de manifiesto la importancia de la CP12 en el proceso de degradación del carbono y el crecimiento de las plantas de tabaco, lo que lleva a proponer funciones distintas a la de la formación de complejos (Howard et al., 2011; López-Calcagno et al., 2014).

La sincronización de los procesos de síntesis y degradación de almidón en los plastidios es crucial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. En células del mesófilo de hojas de *A. thaliana* se ha evidenciado que la TRX *f1* actúa como un activador de la AGPasa (Figura 7) en presencia de luz (Thormaehlen et al., 2013) gracias a ensayos realizados con el mutante de pérdida de función *trxf1*. La isoforma *trxf1* mostró un estado de activación redox de la AGPasa menor al de las plantas silvestres, así como una disminución en la relación almidón/sacarosa. Paralelamente, ensayos *in vitro* mostraron que la actividad de la AGPasa resultante de la reducción por las TRXs *m1*, *x* e *y1*, es menos eficiente que la ejercida por TRX *f1*, y por otro lado el contenido de almidón en las líneas de tabaco transplastómicas que sobreexpresan *NtTRXf* se incrementa (Sanz-Barrio et al., 2013), aunque poco en comparación con el tipo silvestre (Rey et al., 2013).

En células guarda estomáticas la TRX *f1* también es capaz de ejercer un control sobre la degradación del almidón a través de la reducción de la enzima BAM1 (Figura 7), una  $\beta$ -amilasa de *A. thaliana* (Valerio et al., 2011). En células del mesófilo, donde la TRX *f1* activa la síntesis de almidón, BAM1 se induce bajo situaciones de estrés osmótico.

También se ha comprobado que la NTRC participa en la regulación de la síntesis de almidón, pues las plantas de *A. thaliana* mutantes *ntrc*, muestran una disminución de la activación redox de la AGPasa y no son capaces de sintetizar suficiente almidón durante el período de luz. Por tanto en condiciones de día corto, la NTRC parece actuar como un importante regulador redox de la síntesis de almidón y el metabolismo de plastidios fotosintéticos y no fotosintéticos (Michalska et al., 2009; Lepistö et al., 2013). En, En las plantas *ntrc*, el desarrollo de las raíces es menor, siendo la tasa de crecimiento más lento y el menor el número de raíces laterales en relación al control, indicando un papel importante de *AtNTRC* en los

tejidos no fotosintéticos como la activación de BAM1 (Valerio et al., 2011; Kirchsteiger et al., 2012).

Las TRXs *x*, *y*, y *z* tienen potenciales redox más altos (> -340 mV) que las TRX *f* y *m* (<-350 mV) (Collin et al., 2003; Collin et al., 2004; Chibani et al., 2011). Puesto que una de las propiedades que determina la especificidad funcional de las TRXs es su potencial, dicha diferencia confiere a estas isoformas distinta capacidad de activar enzimas diana de otras TRXs plastidiales como las del metabolismo de carbono.

Si bien las TRX *y1* e *y2* no son capaces de activar a la cFBP1 (Collin et al., 2004) y lo hacen parcialmente en el caso de la NADP<sup>+</sup>-MDH, fue descrita como diana potencial de estas isoformas una fructosa bisfosfato aldolasa putativa cuyo producto de reacción sirve como sustrato de la cFBP1 y participa en la respuesta de las plantas al estrés abiótico (Lu et al., 2012).

#### C.4.3.- Activación de la actividad oxidativa de la G6PDH.

Como se ha detallado anteriormente, la G6PDH cataliza la primera etapa de la vía OPP, fuente importante de NADPH para las células heterótrofas de plantas y tejidos fotosintéticos durante el período nocturno. Hasta el momento se han identificado en *A. thaliana* seis genes que codifican para esta enzima, cuatro de ellas correspondiente con isoformas plastidiales (Wakao and Benning, 2005), lo que evidencia la importancia de la vía OPP en estos compartimentos subcelulares. Mediante ensayos *in vitro* se ha demostrado que la inactivación por reducción con DTT, es una característica común de al menos tres de las cuatro isoformas plastidiales (AtG6PDH1, AtG6PDH2, y AtG6PDH3) que además no comparten con las isoformas citosólicas. *AtG6PDH1* se expresa principalmente en tejidos fotosintéticos, mientras que los transcritos de *AtG6PDH2* y *AtG6PDH3* se acumulan principalmente en las raíces (Wakao and Benning, 2005).

A pesar de que se tiene constancia de que la inactivación de la G6PDH está mediada por TRXs de tipo *m* (Figura 7) (Wenderoth et al., 1997), estudios posteriores han demostrado que la TRX *f1* de *A. thaliana* es capaz de regular la actividad AtG6PDH1 *in vitro* tan eficientemente como la TRX *m1* o la *m4* (Née et al., 2009).

#### C.4.4.- Regulación de la biosíntesis de lípidos en plastidios.

La ACCasa es una enzima que interviene en la producción de malonil-CoA tomando como precursor acetil-CoA, paso clave en la ruta de síntesis de ácidos grasos en plástidos. Ensayos *in vitro* demostraron que, en ausencia de un agente reductor, es inactiva pero pasa a su forma activa después de la adición de DTT y de TRX *f1* y TRX *m* en estado reducido (Sasaki et al., 1997).

La ACCasa cloroplastial consta de 4 polipéptidos: la subunidad biotina carboxilasa, la subunidad portadora de biotina carboxilada, la subunidad transcarboxilasa  $\alpha$  y la subunidad transcarboxilasa  $\beta$ , respectivamente con tres, uno, dos y cinco residuos de Cys (Sasaki et al., 1997). Por lo tanto, cada una de las subunidades de la ACCasa es potencialmente controlada por la regulación redox utilizando diversos mecanismos (Figura 7). Se ha sugerido que una de las subunidades transcarboxilasa ( $\alpha$  o  $\beta$ ) media en la regulación redox (Kozaki and Sasaki, 1999).

El monogalactosildiacilglicerol (MGD) es un importante componente lipídico de las membranas plastidiales sintetizado a partir de diacilgliceroles (DG) por la MGDG sintasa, una enzima ligada a membrana que posee nueve residuos de Cys conservados. Se ha comprobado que *in vitro* la actividad MGD sintasa depende de la presencia de agentes reductores tales como DTT, es inhibida por agentes tiol-alkilantes y es modulada por TRXs que actúan sobre enlaces disulfuro intramoleculares (Figura 7) (Yamaryo et al., 2006). Este tipo de regulación en vegetales podría permitir la síntesis de galactolípidos de cadena larga en coordinación con la actividad fotosintética del cloroplasto, fomentando la sustitución eventual de lípidos de membrana oxidados bajo condiciones celulares que causan estrés oxidativo (Yamaryo et al., 2006)

#### C.4.5.- Control de la homeostasis frente a especies reactivas del oxígeno.

Las ROS tienen asociada una acción bivalente. Por un lado originan daños perjudiciales en los sistemas biológicos cuando son producidas en condiciones de estrés biótico y abiótico, pero por otro lado, juegan un papel crucial en procesos de señalización celular actuando como mensajeros secundarios (Foyer and Noctor, 2005). Por ello, es importante que exista un control de la homeostasis en

la célula entre la producción y la eliminación de ROS, ya que un desequilibrio sería el responsable de la activación de procesos de estrés oxidativo.

Para evitar situaciones de estrés oxidativo derivadas de las condiciones y restricciones ambientales, las plantas han desarrollado sistemas antioxidantes constituidos por moléculas de bajo peso molecular como glutatión y ascorbato (Noctor and Foyer, 1998) y distintas familias de enzimas antioxidantes, entre ellas las TRXs y las GRXs.

Varias TRXs plastidiales de plantas participan en la respuesta frente condiciones estresantes (Vieira and Rey, 2006), por un lado mediante la reparación de proteínas oxidadas por por la situación de estrés oxidativo (Tarrago et al., 2009), y por otro a través del suministro de potencial de reducción necesario componentes de los sistemas antioxidantes como las PRXs y las MSRs capaces de reducir peróxidos orgánicos (Dietz, 2011).

Las PRXs son enzimas con actividad peroxidasa que catalizan la transferencia de electrones de grupos sulfidrilos a peróxidos y que se encuentran implicadas en procesos de señalización redox y de detoxificación de moléculas e iones oxidantes. Se han descrito cuatro grupos en plantas: 1-Cys PRX, PRXII, PRXQ y 2-Cys PRX, en base al número y posición de las Cys de su sitio activo (Rouhier et al., 2004). Como se comentó en apartados anteriores la 2-Cys PRX y la PRX Q han sido catalogadas como importantes dianas de las TRXs plastidiales.

Las MSRs son proteínas implicadas la oxidación de metionina a sulfóxido de metionina cuya regeneración se consigue generalmente mediante la reducción ejercida por las TRXs (Tarrago et al., 2009). El genoma de *A. thaliana* contiene cinco genes *MSRA* y nueve *MSRB*. Con respecto a las isoformas de *MSRA* se ha propuesto para reparan las proteínas dañadas durante la fase de oscura, evitando así la pérdida de recursos debido al aumento del recambio de proteínas. Dos isoformas de *MSRB*, *AtMSRB1* y *AtMSRB2*, están localizadas en los cloroplastos de *A. thaliana*, dónde se ha propuesto que protegen las antenas fotosintética del daño oxidativo y así preservan el crecimiento y desarrollo en condiciones de estrés ambiental. En *M. truncatula* a estas mismas isoformas, junto con la *MSRA4*, se les ha asignado un papel clave en la preservación de la integridad de la semilla

(Châtelain et al., 2013). Por último, AtMSRB7 y AtMSRB8 parecen expresarse preferentemente en raíces (Li et al., 2012).

La CDSP32 (*Chloroplastic drought-induced stress protein of 32 KDa*, proteína cloroplastídica de 32 kDa inducida por estrés por sequía) fue aislada por primera vez en plantas de patata sometidas a déficit hídrico (Rey et al., 1998). Esta TRX plastidial proporciona electrones a PRXs y MSR como lo demuestran experimentos *in vitro* e *in planta* (Broin et al., 2002; Rey et al., 2005; Tarrago et al., 2010) (Figura 8).

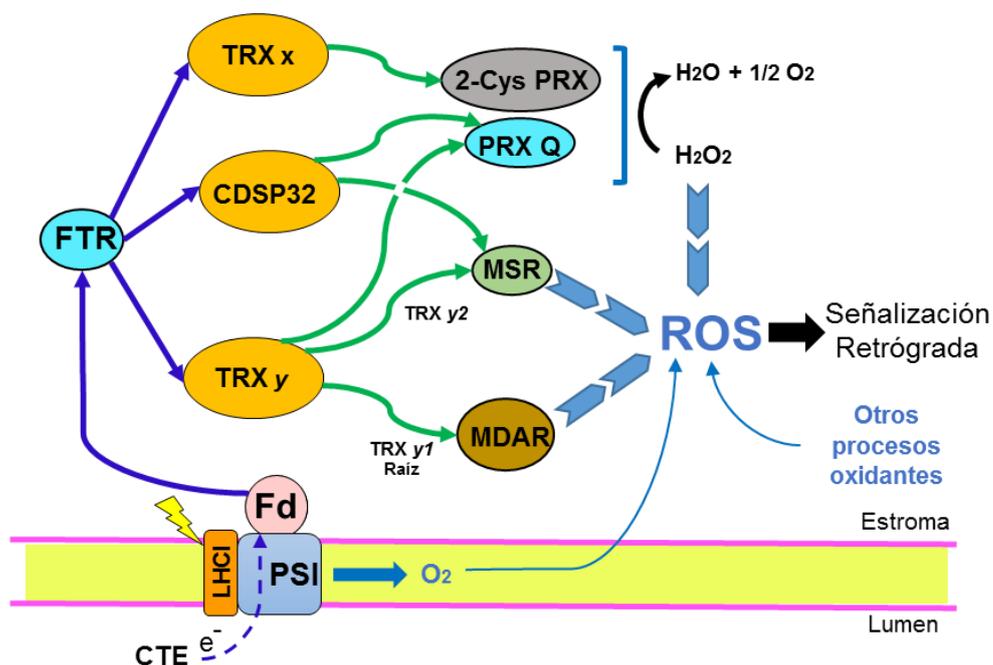


Figura 8.- Esquema de la señalización redox mediada por las TRX x e y en plástidos. Se muestran los procesos fisiológicos centrales regulados por estas isoformas. Flechas: azul discontinuo (transporte electrónico), azul continuo (sistema de reducción de TRXs), verde (activación) y rojo (represión).

La abundancia de proteínas CDSP32 en patata disminuye sustancialmente con la edad de la hoja en las plantas bien regadas, pero este patrón de desarrollo de la expresión se pierde en condiciones de estrés hídrico, que se traducen en una disminución y el aumento de la abundancia de proteína en hojas jóvenes y adultas, respectivamente (Broin et al., 2003). Por otro lado, la mayor expresión CDSP32 en las hojas jóvenes está probablemente relacionada con el hecho de que estas hojas se caracterizan porque su maquinaria fotosintética no es totalmente funcional y propenso al daño por luz, en comparación con las hojas adultos y senescentes que cuentan con mecanismos más eficientes de defensa

frente antioxidantes incluso en la ausencia de estreses ambientales (Bowler et al., 1992; Havaux et al., 2000). Las TRXs como la CDSP32 que tienen predominantemente una función antioxidante podrían tener un papel indirecto para la buena marcha del desarrollo de la planta a través del mantenimiento de las estructuras celulares en las etapas muy específicas, tales como hojas jóvenes en desarrollo.

Aunque los transcritos de TRX *m3* son los menos abundantes de todas las TRXs plastidiales en hojas, su presencia en raíz ha sido observada en plastidios del meristemo apical (Benitez-Alfonso et al., 2009) y sus niveles de ARNm en este órgano son comparables a los de TRX *m2*, *m4*, y *x* (Bohrer et al., 2012). Así mismo la TRX *m3* ha sido relacionada funcionalmente con los procesos de homeostasis de las ROS en las raíces, la deposición de callosa y el transporte plasmodesmal y fenotípicamente se implicó con la letalidad en el mutante con pérdida de función *gat1* (Benitez-Alfonso et al., 2009; Benitez-Alfonso and Jackson, 2009). Aunque se ha demostrado experimentalmente la presencia de las isoformas TRX *f* y *m* de *Pisum sativum* en raíces (Barajas-López et al., 2007), no hay información acerca de la expresión tisular precisa de éstas, a excepción de la TRX *m3*.

Desde hace varios años se conoce que las TRXs *y1* e *y2* actúan como activadores eficientes de enzimas implicadas en procesos de detoxificación siendo reductores eficaces de enzimas como la PRX Q (Collin et al., 2004). En base a los patrones de expresión en *A. thaliana*, ambas isoformas podrían cumplir con funciones antioxidantes en etapas específicas de desarrollo de la planta: *AtTRXy1* se expresa en órganos no fotosintéticos como las semillas y las raíces, mientras que *AtTRXy2* lo hace principalmente en las hojas (Collin et al., 2004). A pesar de ello, esta última isoforma fue usada para la búsqueda de dianas en raíces (Marchand et al., 2010), encontrándose numerosas proteínas involucradas en la detoxificación y la defensa frente a las ROS, como es el caso de la monodehidroascorbato reductasa (MDAR) (Figura 8) implicada en la regeneración del ascorbato reducido. Por otro lado, líneas mutantes de *A. thaliana* deficientes en *AtTRXy2* tienen una capacidad MSR disminuida en hoja, un crecimiento reducido y muestran hojas de fenotipo verde pálido cuando son cultivadas en

condiciones de día largo con luz de alta intensidad (Collin et al., 2004; Laugier et al., 2013).

En base a estos datos se ha propuesto a la TRX *y2* como donador de electrones fisiológico de las MSR<sub>s</sub> y de la MDAR (Figura 8), si bien no se puede descartar el solapamiento para esta función con otros tipos de TRX<sub>s</sub> porque estudios *in vitro* recientes han demostrado que las TRX<sub>s</sub> *f1*, *f2*, *m4*, *x* y *z* de *A. thaliana* también son capaces de reducir a las MSR<sub>s</sub> (Yoshida et al., 2015). En cuanto a la TRX *y1*, se la relaciona con procesos de mantenimiento de la capacidad de reparación de proteínas y en la senescencia de las semillas por estar asociado a la activación de isoformas de MSR<sub>s</sub> expresadas en esta localización (Châtelain et al., 2013).

La ausencia de TRX *x* en líneas mutantes de *A. thaliana* (*trxx*) desencadena la carbonilación de proteínas, un conocido marcador de estrés, pero no afecta a la fotosíntesis o a la fijación de carbono en condiciones de día largo (Pulido et al., 2010). Sin embargo, bajo condiciones de luz continua la fijación de CO<sub>2</sub> es afectada, lo que sugiere que la TRX *x* puede desempeñar un papel más importante bajo condiciones ambientales estresantes. Este posible rol se apoyaría además en el hecho de que la TRX *x* ha sido descrita como activador de la 2Cys-PRX en cloroplastos (Pulido et al., 2010) (Figura 8).

La capacidad de la TRX *z* para activar algunas PRX<sub>s</sub> y MSR<sub>s</sub> ha llevado a algunos autores (Chibani et al., 2011) a proponer también a esta isoforma como donador de electrones alternativo a enzimas detoxificantes de ROS.

Por último, se ha observado que LTO1 produce *in vitro* la reducción de la inmunofilina FKBP13 y se le ha relacionado con el mantenimiento de la homeostasis redox frente a las ROS (Lu et al., 2013).

Todos estos datos revelan papeles relativamente inesperados para las PRX<sub>s</sub> y las MSR<sub>s</sub> en el desarrollo de la planta, incluso en ausencia de restricciones ambientales. Probablemente, como mediadores de la homeostasis redox celular en relación con otros actores como hormonas y ROS. Así las TRX<sub>s</sub> plastidiales y estas dianas son propensos a actuar en los mecanismos que regulan la plasticidad fenotípica de las plantas en relación con las variaciones ambientales

(Li et al., 2012). Por ejemplo, las situadas en el compartimiento plastidial podrían actuar como sensores o participar en las vías de transducción regulando la expresión génica nuclear.

Estas vías, conocidas como de “señalización retrógrada” (Figura 8), establecen relaciones entre estatus fotosintético de excitación y los procesos de desarrollo, permitiendo así la adaptación de las plantas a condiciones ambientales cambiantes.

C.4.6.- Regulación de la transcripción de genes plastidiales.

El potencial de excitación entre los fotosistemas PSI y PSII genera un *pool* de plastoquinonas (PQ) reducidas u oxidadas que actúan como señales de control en la fosforilación de los complejos LHC del PSII a través de la quinasa asociada a tilacoide, STN7 (Lemeille and Rochaix, 2010; Pesaresi et al., 2010).

Las mismas señales también activan una cascada de fosforilación a través de ARN polimerasas codificadas en plastidios (*Plastid-encoded RNA polymerase*, PEPs) y que desembocan en cambios de la expresión génica de elementos implicados en la fotosíntesis (Allen and Pfannschmidt, 2000) (Figura 9).

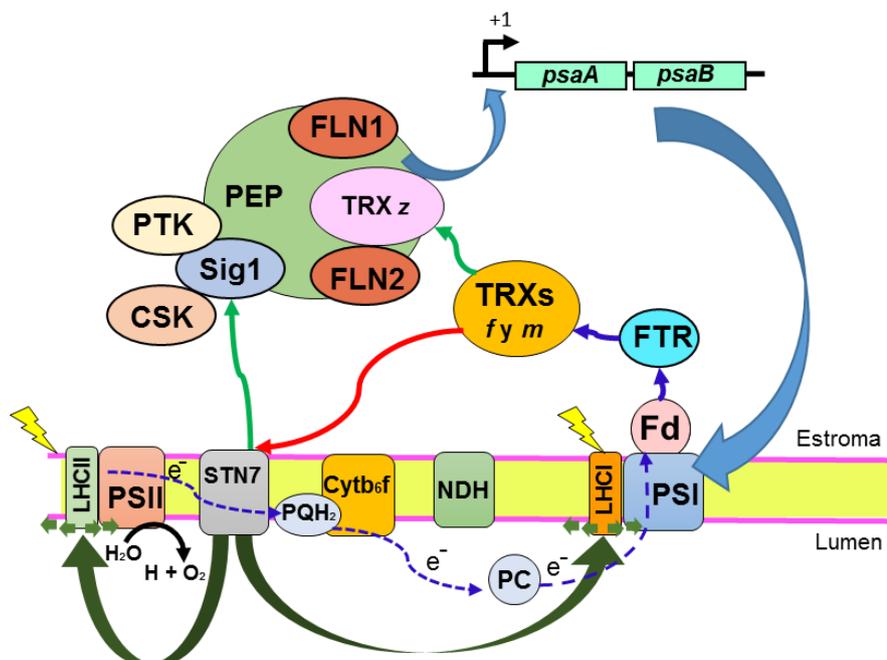


Figura 9.- Esquema de la señalización redox mediada por TRX z en plástidos. Se muestran los procesos fisiológicos centrales regulados por estas isoformas. Flechas: azul discontinuo (transporte electrónico), azul continuo (sistema de reducción de TRXs), verde (activación) y rojo (represión).

Ambos procesos tienen como objetivo mantener la eficiencia fotosintética. La cascada de fosforilación probablemente incluye la acción de otras quinasas como la CSK (quinasa sensora de cloroplasto) y la PTK (quinasa asociada a transcripción en plastidios), generando una red de fosforilación.

La reducción del pool de PQ activa a la STN7, que proporciona una señal a los demás componentes de la red quinasa (Figura 9). Esta controla el estado de fosforilación del factor sigma Sig1 que a su vez regula la transcripción relativa de genes del centro de reacción de la fotosíntesis *psbA* (que codifica la proteína D1 de PSII) y *psaA/B*, que lo hace para la apoproteína P700 del PSI (Shimizu et al., 2010). Esto es apoyado por la interacción vista entre CSK, PTK y Sig1 en ensayos de Y2H en levadura (Puthiyaveetil et al., 2010).

Experimentos de transcripción en presencia de inhibidores de quinasas y/o agentes reductores (DTT), indicaron que esta red de fosforilación interactúa con una segunda señal tiol-dependiente (Steiner et al., 2009). Aunque anteriormente se había demostrado que la PTK estaba bajo el control redox de glutatión (Ogrzewalla et al., 2002), su actividad no podía ser modulada por DTT. En base a esto se sugirió la implicación de la TRX z como un regulador (Arsova et al., 2010; Schröter et al., 2010). Adicionalmente, un *screening* mediante Y2H determinó que la TRX z interactúa con dos fosfofructoquinasas-*like* cloroplastídicas denominadas FLN1 y FLN2. Esto fue confirmado posteriormente *in planta* mediante ensayos de co-localización por microscopía confocal (Arsova et al., 2010).

La línea *knock-out trxz* de *A. thaliana* exhibe hojas verde pálido y carece de capacidad de crecimiento autótrofa siendo solo viable en medio suplementado con sacarosa. Estos datos concuerdan con los observados en *N. benthamiana*, donde bajos niveles de proteína TRX z inducen un fenotipo clorótico (Meng et al., 2010). Este, es un fenotipo único ya que el sistema TRX es altamente redundante y puede compensar fácilmente la pérdida de componentes individuales.

Puesto que el fenotipo de líneas de silenciamiento para FLN1 y FLN2 en *A. thaliana* es muy parecido al del mutante *trxz* y el análisis de expresión génica en los 3 mutantes deficientes indicaba los mismos perfiles de expresión de genes plastidiales, se postuló que las tres proteínas eran componentes del complejo PEP de los cloroplastos (Figura 9)(Arsova et al., 2010). Este hecho fue confirmado

posteriormente por espectrometría de masas (Schröter et al., 2010). La falta de TRX z impediría por tanto un correcto ensamblaje del complejo PEP y, en consecuencia, se reprimiría la transcripción de genes cloroplastídicos, apoyando la hipótesis de que esta isoforma participa en la regulación del desarrollo de plastos verdes durante sus primeras etapas de formación (Wang et al., 2014).

Sin embargo, estudios de complementación de mutantes para TRX z con el sitio redox inactivo sugirieron que la actividad redox de esta proteína es prescindible para el funcionamiento de PEP bajo condiciones estándar (Arsova et al., 2010; Wimmelbacher and Börnke, 2014) .

Los ensayos de reducción realizados *in vitro* han mostrado que las TRXs *f1* y *m1* se comportan como buenos reductores de la TRX z (Bohrer et al., 2012) así como de la cFBP1, una de la proteínas que encuentran implicadas en la formación de los complejos de transcripción PEP en la planta de la mostaza (Schröter et al., 2010). Se podría especular con que estas isoformas, además de regular los procesos de fotosíntesis mencionados, podrían actuar también como moléculas de señalización redox que vinculan la fotosíntesis con el proceso de transcripción en plastidios, usando como mediador no estrictamente necesario, a la TRX z.

#### C.4.7.- Actividad chaperona.

Muy recientemente se ha empezado a describir otra función bioquímica para las TRXs plastidiales. Se trata de la emergente actividad chaperona, observada en las TRXs *f* y *m* de tabaco, y que ha sido relacionada con los mecanismos de plegamiento, importación y traducción de proteínas en plastidios.

Tanto NtTRX *f* como NtTRX *m*, demostraron *in vitro* una actividad chaperona foldasa al reactivar G6PDH previamente desnaturalizada, y una actividad chaperona holdasa al evitar la agregación de la NADP<sup>+</sup>-MDH inducida por calor (Sanz-Barrio et al., 2012).

Los resultados permitieron inferir que las funciones disulfuro reductasa y chaperona foldasa prevalecen cuando las TRXs se encuentran como monómeros, siendo crítica para ambas funciones la Cys no activa localizada en el sitio activo.

Por el contrario, la actividad chaperona holdasa depende de su estado oligomérico, de manera que solo se produce cuando las TRXs se asociaron con

complejos de proteínas de alto peso molecular. Debido a que el estado oligomérico de ambas TRXs es inducido por sal y temperatura, se ha sugerido que las TRXs plastidiales podrían funcionar como chaperonas moleculares con actividad holdasa en condiciones de estrés oxidativo (Sanz-Barrio et al., 2012).

### **C.5.- Regulación de la actividad de TRXs plastidiales.**

El único caso de proteínas activadoras de TRXs conocido hasta ahora son las CDCPS (Yoo et al., 2011), caracterizadas por contener un dominio cistationina  $\beta$ -sintasa plastidial (CBS). Dichas proteínas son miembros de una gran superfamilia de proteínas ubicuas capaces de unirse a ligandos que contienen adenosina, tales como AMP, ATP o S-adenosil metionina.

En *A. thaliana* y arroz, se han descrito 34 y 59 CDCPS respectivamente (Kushwaha et al., 2009). Se ha observado que la localización de las CDCPS puede ser en diferentes compartimentos subcelulares, apareciendo las isoformas CBSX1 y CBSX2, en plastos donde son capaces de activar a las TRXs *f*, *m*, *x*, e *y* (Yoo et al., 2011).

El mutante de pérdida de función *cbsx1* muestra un retraso importante en el crecimiento, mientras que las plantas que sobreexpresan CBSX1 son capaces de crecer de forma más rápido en un medio exento de sacarosa y muestran una senescencia retardada en comparación con las plantas de tipo silvestre, asemejándose a las plantas transgénicas que sobreexpresan TRX *m* (Benitez-Alfonso et al., 2009).

CBSX1 sería un regulador de los procesos fisiológicos en tejidos no verdes mientras CBSX2 sería una proteína específica de tejido fotosintético, lo que refuerza la idea antes mencionada de la presencia de un FTS plenamente activo en órganos heterotróficos.





## **II.- MATERIALES Y MÉTODOS**



## A.- Sección I: Material biológico.

### A.1.- *Arabidopsis thaliana*.

#### A.1.1.- Cultivo en tierra.

*A. thaliana* se sembró en semilleros con turba vegetal (Compo Sana Universal) previamente humedecida y se estratificaron durante 48 h para sincronizar la germinación. Las plantas se incubaron a 22 °C y 60% de humedad con un fotoperiodo de día largo (16 h luz / 8 h oscuridad) en una cámara de crecimiento FitoClima S600 (Aralab) a una intensidad lumínica de 120  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

#### A.1.2.- Cultivo *in vitro*.

Los cultivos *in vitro* se realizaron en medio  $\frac{1}{2}$  x MS (Duchefa Biochemie) solidificado con 0,6% (o 0,9% para crecimiento en cajas en posición vertical) de *phytoagar* (Duchefa Biochemie) y tamponado a pH 5.7 con 0,05% de tampón MES (Sigma-Aldrich).

Las semillas se esterilizaron incubándolas durante 3 min en una solución de etanol al 50% (v/v) y tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,5% (v/v) y lavándolas con etanol 96%, tras lo cual fueron depositadas sobre un papel de filtro estéril situado en una campana de flujo laminar. Una vez sembradas se dejaron en estratificación durante 48 h. Posteriormente se pasaron a una cámara de crecimiento MLR-350 (Sanyo) bajo las mismas condiciones de crecimiento mencionadas anteriormente para el cultivo en tierra.

### A.2.- Guisante (*Pisum sativum*).

Parte de los trabajos experimentales de esta tesis doctoral se ha realizado con plantas de guisante (*Pisum sativum*) cultivar Lincoln, perteneciente a la familia de las leguminosas (*Fabaceae*).

#### A.2.1.- Cultivo en vermiculita.

Las semillas de guisante se sembraron, previa imbibición, en macetas con vermiculita humedecida y se incubaron en una cámara de cultivo con las siguientes condiciones de crecimiento: fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de

oscuridad (día largo), 120  $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica y 22 °C de temperatura.

#### A.2.2.- Esterilización de semillas y germinación en cajas de Petri.

Las semillas de guisante se esterilizaron incubándolas durante 1 min en una solución de etanol al 70%. Transcurrido este tiempo se retiró el etanol y se añadió una solución de lejía comercial al 70% y Tween-20 (Sigma Aldrich) al 2,5%, incubándose durante 15 min. Finalmente se lavaron 3 veces con agua estéril. Las semillas esterilizadas se depositaron en cajas de Petri en cuyo fondo se colocaron 3 láminas de papel de filtro estéril embebidas en H<sub>2</sub>O calidad mq estéril o alguna solución tratamiento que dependieron de las condiciones del experimento. Las semillas se incubaron a 4 °C durante 48 h (estratificación). Posteriormente se pasaron a una cámara de cultivo MLR-350 (Sanyo) y se incubaron en las mismas condiciones de crecimiento que para el cultivo en vermiculita.

#### **A.3.- *Escherichia coli*.**

Se han utilizado dos tipos de cepas de *E. coli* dependiendo de la finalidad del experimento:

- Top10 (Invitrogen-Life Technologies) fue utilizada para la clonación de fragmentos de ADN. Siendo este el genotipo: F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1  $\lambda$ <sup>-</sup>. Es resistente al antibiótico estreptomycin.
- BL21 (DE3) se utilizó para la expresión de proteínas recombinantes. Su genotipo es F<sup>-</sup>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)  $\lambda$  (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5]) y presenta resistencia a cloranfenicol.

Ambas cepas se cultivaron en medio Luria-Bertani, LB (McCorkle, 1983), cuya composición es 5 g/l de extracto de levadura (Duchefa Biochemie), 10 g/l de bacto triptona (Duchefa Biochemie) y 10 g/l de NaCl (Merck). Para medios sólidos (LB-agar) se añadió 15 g/l de agar bacteriológico.

Para la selección de las bacterias portadoras de plásmidos, el medio LB se suplementó con el correspondiente antibiótico. Los antibióticos fueron esterilizados por filtración con filtros Millipore® de nitrocelulosa de 0,2 µm de diámetro de poro. Las concentraciones de los antibióticos empleados fueron: ampicilina 100 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL e higromicina 100 µg/mL. Para un óptimo crecimiento de *E. coli* las cajas de cultivo se incubaron en una estufa a 37 °C o mediante agitación a la misma temperatura para cultivos líquidos.

#### **A.4.- *Agrobacterium tumefaciens*.**

La cepa de *A. tumefaciens* empleada de forma rutinaria para los protocolos de transformación vegetal fue GV310::pMP90. Estas bacterias son capaces de llevar a cabo la transgénesis gracias a que contienen el plásmido pMP90 pTi58Δ-ADN (Koncz and Schell, 1986). El cromosoma bacteriano aporta resistencia frente a rifampicina, mientras que el plásmido pMP90 lo hace frente a gentamicina.

Para el cultivo líquido de *A. tumefaciens* se siguió un protocolo idéntico al descrito para *E. coli*. La selección de clones se llevó a cabo añadiendo al medio los siguientes antibióticos esterilizados por filtración: gentamicina y kanamicina a una concentración de 20 µg/ml y 50 µg/ml, respectivamente. Las incubaciones se llevaron a cabo a 28 °C y en agitación.

El cultivo en medio sólido se realizó en medio LB-agar con los antibióticos de selección indicados anteriormente para medio líquido. Las placas se incubaron en una estufa a 28 °C durante 48 h.

#### **A.5.- *Saccharomyces cerevisiae*.**

La cepa de levadura EMY63 utilizada para los experimentos de complementación heteróloga posee el genotipo *MATa, ade2-1, ade3-100, his3-11, leu2-3, lys2-801, trp1-Δ1, ura3-1, trx1::TRP1, trx2::LEU2* y es auxótrofa para adenina, lisina e histidina (Muller, 1991). Esta línea deriva de la cepa parental EMY60 y es un mutante con pérdida de función para las TRXs citosólicas de levadura.

Para el cultivo líquido de las levaduras se utilizó el medio rico YPDA y el medio mínimo SD. El medio YPDA se compone de 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de bactopectona, 20 g/l de glucosa y 40 mg/l de adenina.

El medio mínimo SD contiene 6,7 g/l de extracto de levadura nitrogenado (YNB), 20 g/l de glucosa y 20 g/l de bactoagar. El medio SD se ajustó a pH 5,8 con KOH y se suplementó con los compuestos requeridos por cada cepa para complementar las auxotrofías. Las incubaciones se llevaron a cabo a 28 °C y en agitación.

Para el cultivo sólido de las levaduras se usaron los medios YPDA-agar y SD-agar, de idéntica composición a las utilizadas para el medio líquido pero con 20 g/l de bactoagar. Las incubaciones se llevaron a cabo a 28 °C durante 48 h.

## **B.- Sección II: Análisis y manipulación de ácidos nucleicos.**

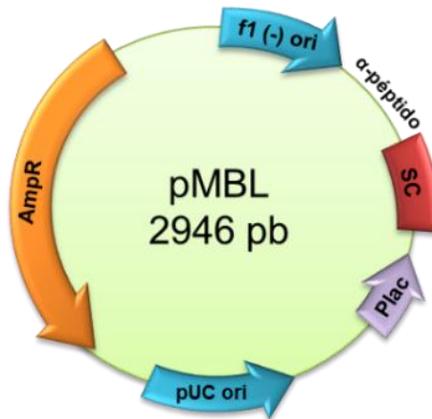
### **B.1.- Vectores.**

#### B.1.1.- Vector pMBL.

El vector pMBL (Dominion-MBL, figura 10) se usó para la clonación de productos de PCR amplificados con una Taq polimerasa (con actividad transferasa de una adenina a los extremos 3' del ADN), ya que este plásmido es indicado para la clonación T/A por poseer una timina protuberante en los extremos 5' del vector.

Su sitio de clonación presenta secuencias diana para las enzimas de restricción más comunes.

La selección de bacterias transformadas con construcciones de pMBL se realizó en medio LB sólido con 100 µg/mL de ampicilina y 20 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal, Apollo Scientific). El X-Gal permite la selección de colonias positivas de color blanco frente a las azules que son negativas debido a que la clonación interrumpe la secuencia del α-péptido de la glucuronidasa.

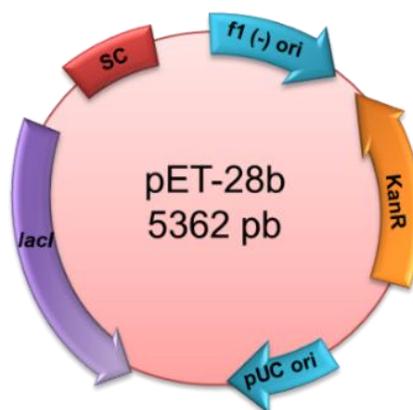


GTTGTA AACGACGGCCAGTGACTGCAGGGTACCACGCGTCTCGAGTCTAGAAGA  
 TCTGCTAGCAGCGGCCGCGAGCTCAAGCTT **GAT\*ATCA**GGCCTCCCGGGGAATTC  
 ACTAGTCATATATGGGATCCGTCGACTTTGGGCCCGGTACCAGCTTTTTGTTCCCTT  
 TAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAAT CATGGTCATAGCTGTTTCCTG

Figura 10.- Representación esquemática del vector pMBL. Arriba: f1 (-) ori: Origen de replicación f1 (-), SC: sitio de clonación, Plac: Promotor del gen lac, pUC ori: origen de replicación pUC, AmpR: gen de resistencia a ampicilina. Abajo: Secuencia de la región SC. Las secuencias subrayadas corresponden a los oligonucleótidos de secuenciación U21 (azul) y Rev21 (verde). La posición del asterisco (\*) indica el sitio de la clonación AT dentro de la diana de restricción para Eco RV (tipografía de color rojo).

### B.1.2.- Vector pET28b.

El vector pET28b (Novagen, figura 11) se usó para la obtención de proteínas recombinantes que poseen una cola de 6 histidinas (*His-tag*) en un extremo del péptido expresado. El sitio de clonación múltiple está localizado aguas abajo de la secuencia promotora de la ARN polimerasa T7 y del operador lac. El plásmido también codifica para la proteína represora LacI, que se une al operador lac impidiendo la transcripción. Cuando el reactivo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) se adiciona al medio de cultivo de la bacteria, este represor se separa del operador lac, permitiendo que la RNA polimerasa se una al promotor de T7 y se inicie la transcripción de la proteína recombinante. La selección de bacterias transformadas con construcciones de pET28b se realizó en medio LB con 50 µg/ml de kanamicina.



AGATCTCGATCCCGCGAAAT **TAATACGACTCACTATAGGG**GAATTGTGAGCGGATAA  
 CAATTC~~CCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGC~~  
 AGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCC**CATATG**GCT  
 Ndel  
 AGCATGACTGGTGGACAGCAAGGTCGG**GATCCGAATTC**GAGCTCCGTCGACAAGCTT  
 BamHIEcoRI  
 GCGGCCGCACTCGAGCA**CCACCACCACCACCAC**TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGC  
 CCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCAC**CCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCT**  
**TGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG**

Figura 11.- Representación esquemática del vector pET28b. Arriba: *f1 (-) ori*: Origen de replicación *f1 (-)*, *pUC ori*: origen de replicación *pUC*, *KanR*: gen de resistencia a kanamicina T7, *lacI*: Secuencia codificante de la proteína *LacI*, *SC*: sitio de clonación. Abajo: Secuencia de la región *SC*. Las secuencias de tipografía de color verde corresponden con el promotor de T7, mientras que las de color azul lo hacen con el terminador T7. Las secuencias subrayadas corresponden a los oligonucleótidos de secuenciación F-T7 (rojo) y R-T7 (verde). La secuencia resaltada en gris corresponde con el operador de *lacI*. Las distintas dianas para enzimas de restricción usadas están designadas con tipografía de distinto color: *Ndel* (rojo), *BamHI* (naranja) y *EcoRI* (verde). La secuencia con tipografía rosa se corresponde con la cola de histidina terminal.

### B.1.3.- Sistema Gateway.

El sistema *Gateway*® (Invitrogen-Life Technologies) se utilizó como metodología alternativa para la clonación de productos de PCR mediante un proceso de recombinación que transfiere segmentos de ADN entre un vector de “entrada” y un vector de “salida”. Esta reacción se denomina LR y está mediada por la enzima clonasa, que reconoce unas secuencias presentes en el vector de entrada, llamados sitios *attL*, así como unos sitios homólogos en el vector de salida, denominados *attR*. El reconocimiento de las secuencias *attL* y *attR* permite a la clonasa la transferencia del fragmento que se desea clonar desde el plásmido de entrada al de salida según se muestra en el esquema en la figura 12.

Los vectores de salida presentan entre las regiones de recombinación *attR* al gen *ccdB* (*control of cell death B*), que codifica para una toxina letal para *E. coli*, permitiendo la selección positiva de las colonias que poseen el plásmido de salida con el fragmento clonado.

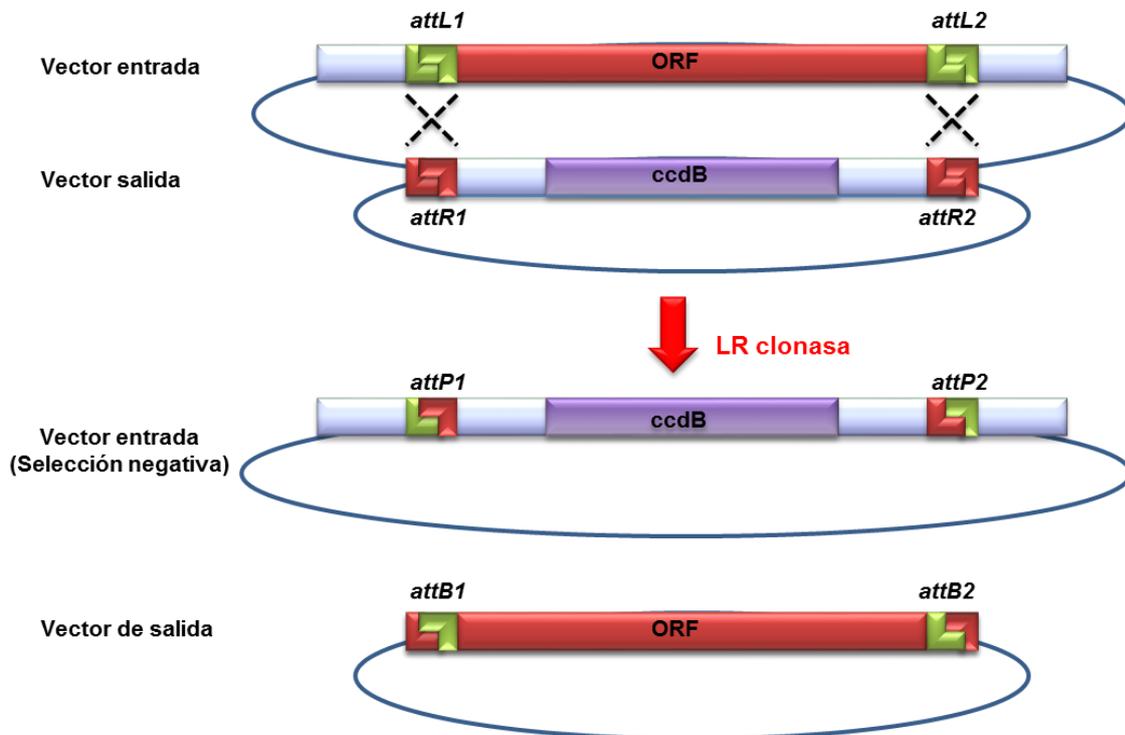


Figura 12.- Representación esquemática del mecanismo de clonación Gateway. ORF: Marco abierto de lectura (Open Read Frame). *attL* y *attR* representa las secuencias flanqueantes de reconocimiento presentes en los vectores de entrada y salida, respectivamente. *attP* y *attB* representa las secuencias flanqueantes conjugadas tras la reacción mediada por la LR clonasa.

- Vector pENTR/D-TOPO.

El vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen-Life Technologies) fue el plásmido de entrada utilizado a lo largo de este trabajo. La secuencia del plásmido es la que se muestra en la figura 13. La selección de bacterias transformadas se llevó a cabo en medio LB con kanamicina 50 µg/ml. Comercialmente pENTR/D-TOPO se presenta como un plásmido linealizado en una región flanqueada por las secuencias *attL1* y *attL2*. La secuencia GTGG protuberante en el extremo 3' está diseñado para hibridar con la secuencia complementaria (CACC) presente en el extremo 5' del fragmento que se quiere clonar, y que fue añadida durante la amplificación por PCR.

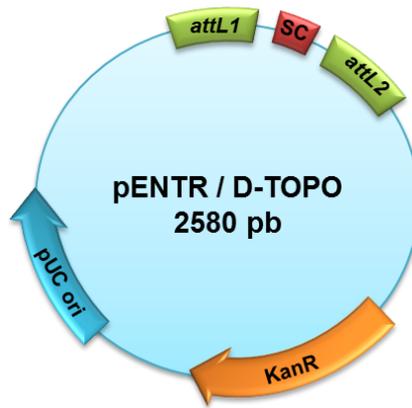


Figura 13.- Representación esquemática del plásmido pENTR/D-TOPO. Las regiones *attl1* y *attl2* se corresponden con las zonas de recombinación. SC: sitio de clonación, KanR: gen de resistencia a kanamicina pUC ori: origen de replicación pUC.

La enzima topoisomerasa I del virus vacuna (proporcionada en el kit) reconoce las secuencias complementarias y promueve su ligación por medio de un residuo de tirosina catalítico según el mecanismo descrito en la figura 14.

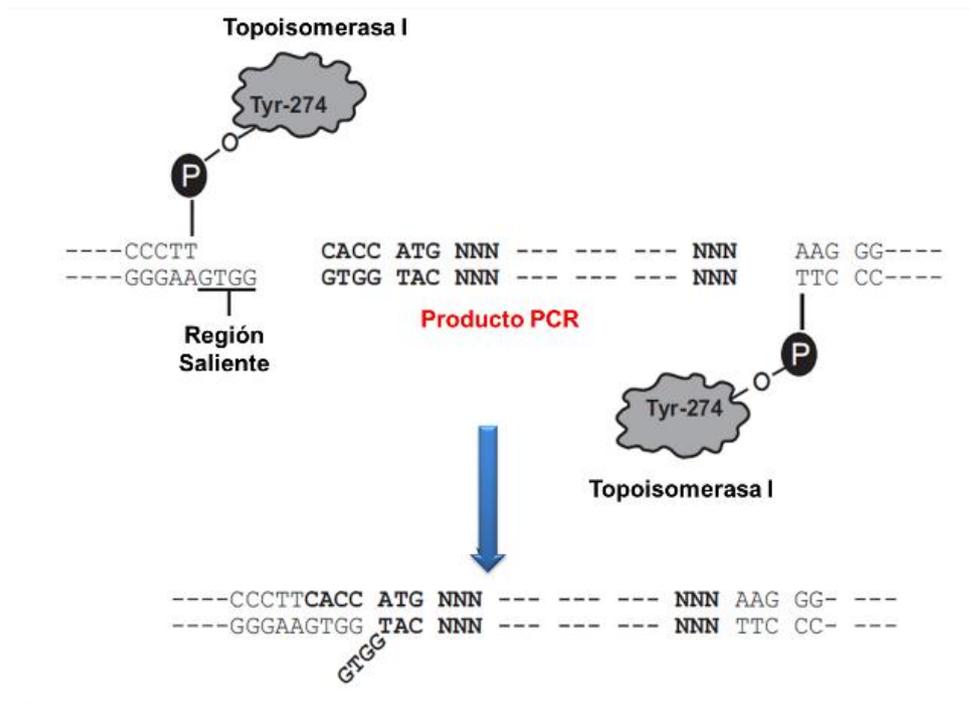


Figura 14.- Mecanismo de clonación en pENTR/D-TOPO (Adaptado de "pENTR Directional TOPO Cloning user manual").

- Vectores pGWB.

En esta tesis se trabajó con una de colección de vectores de la familia pGWB, cedidos por el Departamento de Genómica Molecular y Funcional de la Universidad de Shimane en Japón (Nakagawa et al., 2007). De esta colección se usó el plásmido pGWB4, vector de transformación binario compatible con el sistema de clonación Gateway, que porta el gen codificante para la proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein*, GFP).

La GFP es una proteína capaz de emitir bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible a aproximadamente 510 nm (Heim et al., 1995) pudiendo ser detectada mediante microscopía de fluorescencia.

Después de la reacción LR con pGWB4 (Figura 15) se obtiene un plásmido que contiene la fusión traduccional entre el fragmento clonado y la proteína GFP. La transformación de *A. thaliana* con estos plásmidos de salida según el protocolo descrito en la Sección I, permitió la integración en el genoma de las secuencias contenidas entre las regiones LB y RB.

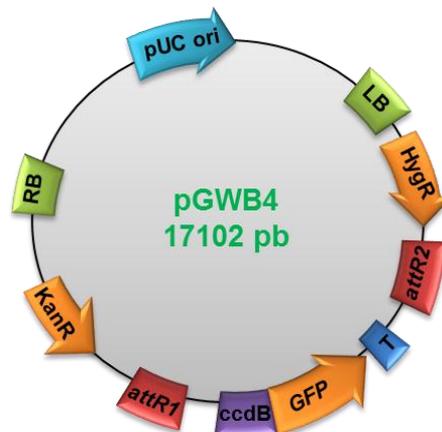


Figura 15.- Representación esquemática del plásmido pGWB4.

## B.2.- Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados usando el programa “*Vector NTI 6.0*” (Invitrogen-Life technologies) y sintetizados por la empresa Sigma-Aldrich. Sus nombres, secuencias y localización son descritos en las tablas 1, 2, 3, 4 y 5, y las figuras 16, 17.

B.2.1.- Aislamiento de líneas mutantes de inserción.

Nombre	Secuencia	Gen / plásmido
5Atm1	GGGCTTTAATGAAACTGCGG	<i>trxm1</i>
3Atm1	ACGGGAAGTACACGTGTAAG	<i>trxm1</i>
5Atm2	CTTTGATTCGTGCTCGTTGG	<i>trxm2</i>
3Atm2	ATCTGAGTAGGTACCCAACC	<i>trxm2</i>
5Atm3	GTTACCTTCTGATTGTATGACTTGTTGA	<i>trxm3</i>
3Atm3	GAAAATGAGACGTGATGGAGGATTT	<i>trxm3</i>
5Atm4-2	GAGCCCAAATACAGCAAACC	<i>trxm4</i>
3Atm4-2	GAAGAAGACAAAGAGGACCC	<i>trxm4</i>
5Atf1	TCATTGGTGCAGCCATTGGC	<i>trxf1</i>
3Atf1	GCTGACGTTTCCTCATCACC	<i>trxf1</i>
5Atf2	GCTGCTGCTTCTCTGTACAC	<i>trxf2</i>
3Atf2	ACCATGTCCTGGTACTTCTC	<i>trxf2</i>
LBSALK	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	pROK2
GABI-kat	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	pAC106
3GUS IV	TCTGCATCGGCGAACTGATC	pWS31

Tabla 1.- Oligonucleótidos usados para el aislamiento de líneas mutantes de inserción.

B.2.2.- Clonación de genes.

Nombre	Secuencia	Gen / plásmido
f1ENT5PROM	<b>CACCA</b> CTGTCTCCGCCTGAG	<i>AtTRXf1</i>
f1ENT3	TCCTCCGGAAGCAGCAGAC	<i>AtTRXf1</i>
F2ENT5PROM2	<b>CACCA</b> AACTCGAGTCTTTCAGTGC	<i>AtTRXf2</i>
f2 ENT3	TCCGCCTGACCTTGCTGCTTC	<i>AtTRXf2</i>
m1ENT5PROM	<b>CACCC</b> CCCTGTGATAGTTGTCACACAAG	<i>AtTRXm1</i>
m1ENT3	CAAGAATTTGTTGATGCTGGTTGC	<i>AtTRXm1</i>
m2ENT5PROM	<b>CACCC</b> CAGCGAGCTAAAGTGACATC	<i>AtTRXm2</i>
m2ENT3	TGGCAAGAACTTGTCGAGGC	<i>AtTRXm2</i>
m3ENT5PROM2	<b>CACCG</b> TCCAATAATTTCCCCACGGAG	<i>AtTRXm3</i>
m3ENT3	TGAGTTCAAGACTCTTTCATGGCG	<i>AtTRXm3</i>
m4ENT5PROM	<b>CACCG</b> GAGAGAGTAGGGAAAATGGAG	<i>AtTRXm4</i>
m4ENT3	CTCGACCAAGAATCTTCTATAGTTTTCTCC	<i>AtTRXm4</i>
3GFP	CGGTGGTGCAGATGAACTTC	pGWB
pGWB5	CCTGCAGGCTCTAATCACAA	pGWB

Tabla 2.- Oligonucleótidos para la clonación de los genes *AtTRXf* y *AtTRXm*. En rojo las secuencias necesarias para la clonación en el vector pENTR/D-TOPO mediante sistema Gateway.

## B.2.3.- Clonación de secuencias codificantes de los ADNc.

Nombre	Secuencia	Gen / Plásmido
5Atf1N	GGGGCATATGGTTGGTCAGGTGACGGAGGT	AtTRXf1
3Atf1B	GGGGGGATCCTCATCCGGAAGCAGCAGACCTCG	AtTRXf1
5Atf2N	GGGGCATATGGTTGGCCAGGTGACGGAGGT	AtTRXf2
3Atf2B	GGGGGGATCCTCAGCCTGACCTTGCTGCTTCAA	AtTRXf2
5Atf1-CS	AATGGTGTGGTCCATCTAAAGTGATTGCC	AtTRXf1
3Atf1-CS	GGGCAATCACTTTAGATGGACCACACCATT	AtTRXf1
5Atf2-CS	AGTGGTGTGGTCCTTCAAAGTGATTGCTC	AtTRXf2
3Atf2-CS	GAGCAATCACTTTGGAAGGACCACACCACT	AtTRXf2
5Atm1N	GGGGCATATGGACACTGCTACAGGAATTCCAGTGG	AtTRXm1
3Atm1B	GGGGGGATCCTCATATTACAAGAATTTGTTGATGCTGG	AtTRXm1
5Atm2N	GGGGCATATGGAAACTACTACCGATATTCAAGTGGTCAATGA	AtTRXm2
3Atm2B	GGATCCCGAGATCTTACAGACTCCAC	AtTRXm2
5Atm3N	GGGGCATATGGCTGAAGTTACACAACGATC	AtTRXm3
3Atm3B	GGGGGGATCCTCATGAGTTCAAGACTCTTTCAA	AtTRXm3
5Atm4N	GGGGCATATGGACACCACTGCCGCCGCCGT	AtTRXm4
3Atm4B	GGGGGGATCCTCACTCGACCAAGAATCTTTCTATAGTTTTCT	AtTRXm4
U-21	GTTGTA AACGACGGCCAGTG	pMBL
Rev-21	CAGGAAACAGCTATGACCATG	pMBL
F-T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pET28b
R-T7	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET28b

Tabla 3.- Oligonucleótidos para clonación de las secuencias codificantes de los ADNc. Tipografía azul: cola poliG añadida para facilitar la digestión de los productos de PCR. Tipografía roja: codón de inicio de traducción. Resaltado en amarillo: lugar de la mutación puntual C35S en TRXf1 y TRXf2. Subrayado en negro: secuencia diana reconocida por la enzima de restricción NdeI. Subrayado en rosa: secuencia diana reconocida por la enzima BamHI.

## B.2.4.- Análisis de expresión génica.

Nombre	Secuencia	Gen
Ps18s-F	CATTCAATCGGTAGGAGCGAC	ARNr 18s
Ps18s-R	AGTAAGCGCGAGTCATCAGCT	ARNr 18s
Psfa	TTAAGCAATCTGAGCCACCTTTATAG	PsTRXf
Psfb	TCATGTTTGATACCCTCTGTAAGTATTTCTA	PsTRXf
Psm1a	CAGTTCCTAAGGCTACTCTGTCTGAG	PsTRXm1
Psm1b	CTTTTGCCTTGTAAGACATGGAAAA	PsTRXm1
Psm2a	AAATTTCTGTGAGGTAACGAACAACA	PsTRXm2
Psm2b	ATCATCTAAAAAACAATAGGGAAGCA	PsTRXm2
5FNR	TGAAGCCGGGATCAGAAGTAA	PsFNR
3FNR	GATGACAGTAGCATTAGGATCTTTTGG	PsFNR
5APX	CGTTGCTTTTATTTTCAATGGATTC	PsAPX1
3APX	CAATAGCTGGGCATTACCACTTAA	PsAPX1

Tabla 4.- Oligonucleótidos usados para análisis de expresión génica de genes de *P. sativum*.

Nombre	Secuencia	Gen
At18s-F	AATATACGCTATTGGAGCTGG	<i>ARNr 18s</i>
At18s-R	ATGGCTCATTAAATCAGTTAT	<i>ARNr 18s</i>
Atf1a	AAACAGCGAGGTCTGCTGCT	<i>AtTRXf1</i>
Atf1b	TAACACCAGATTTTCACATTACATACAAACA	<i>AtTRXf1</i>
Atf2a	TCCGTTATTCTCCGATTACATCTACC	<i>AtTRXf2</i>
Atf2b	GAATTCGGGATCCGGCA	<i>AtTRXf2</i>
Atm1a	AATTCTAGGGTTTCCCGATTACG	<i>AtTRXm1</i>
Atm1b	GAGTCCCATGTTGAATCGTTGA	<i>AtTRXm1</i>
Atm2a	TCTCCGGCTTCGTTGACC	<i>AtTRXm2</i>
Atm2b	GAGCTTCACAGACGACGGCT	<i>AtTRXm2</i>
Atm3a	TCGATTTACACAGCTCGAC	<i>AtTRXm3</i>
Atm3b	TTATCCTGTGGACCATCCGAC	<i>AtTRXm3</i>
Atm4a	AATCGCTCGCGGTGGAC	<i>AtTRXm4</i>
Atm4b	GATTTGGTACTTCGACGGCG	<i>AtTRXm4</i>
qAtCl5	GATATCTCAGCTCTTGGGTC	<i>AtFBPCI</i>
qAtCl3	GATGTATCTCAGTCGGTTGG	<i>AtFBPCI</i>
5Aty1a	GGCCGTCAAATTTTCAGTTTCC	<i>AtTRXy1</i>
5Aty1b	TCTTGTCTTTCAGGGTTTCAC	<i>AtTRXy1</i>
5AGP	CCGTAGGGGAGCATAATGTT	<i>AtAGP</i>
3AGP	ACCACGTTCTTCCCGATCTT	<i>AtAGP</i>
5GPD	AATCCAGTTCGAGACAAG	<i>AtGP6DH</i>
3GPD	CAACCTCATCGTTCTCATG	<i>AtGP6DH</i>
5MDH	CAGAAATGGGGTTCGATCTTC	<i>AtMDH</i>
6MDH	ATCACAGTAGGCAATGCCCT	<i>AtMDH</i>
5NTRC	TGCTTTGTCAGCCGAGAGAT	<i>AtNTRC</i>
3NTRC	TGAAGAAGTGCACACATGGG	<i>AtNTRC</i>
5PRK	TCTGATCCCAGATGACAACG	<i>AtPRK</i>
3PRK	GGCAATGAGCTGCTCATAGA	<i>AtPRK</i>
5SBP	CGGTCCACGAACCACTTATG	<i>AtSBP</i>
3SBP	TCTTCGAAGCGGATGATCTC	<i>AtSBP</i>
5CP12-1	TATTAGGTCCGGTCCGGTT	<i>AtCP12-1</i>
3CP12-1	GAGCCACCAGCTTTCTTCTT	<i>AtCP12-1</i>
5CP12-2	AGAATCGGCCAGTTTGTCTC	<i>AtCP12-2</i>
3CP12-2	TCGTAAGTACGGCACTCGTT	<i>AtCP12-2</i>
5CP12-3	AGAGTGTTGCTTCCGTCACA	<i>AtCP12-3</i>
3CP12-3	TGGATTCTCCTGGCAGAAAC	<i>AtCP12-3</i>

Tabla 5.- Oligonucleótidos usados para análisis de expresión génica de genes de *A. thaliana*.

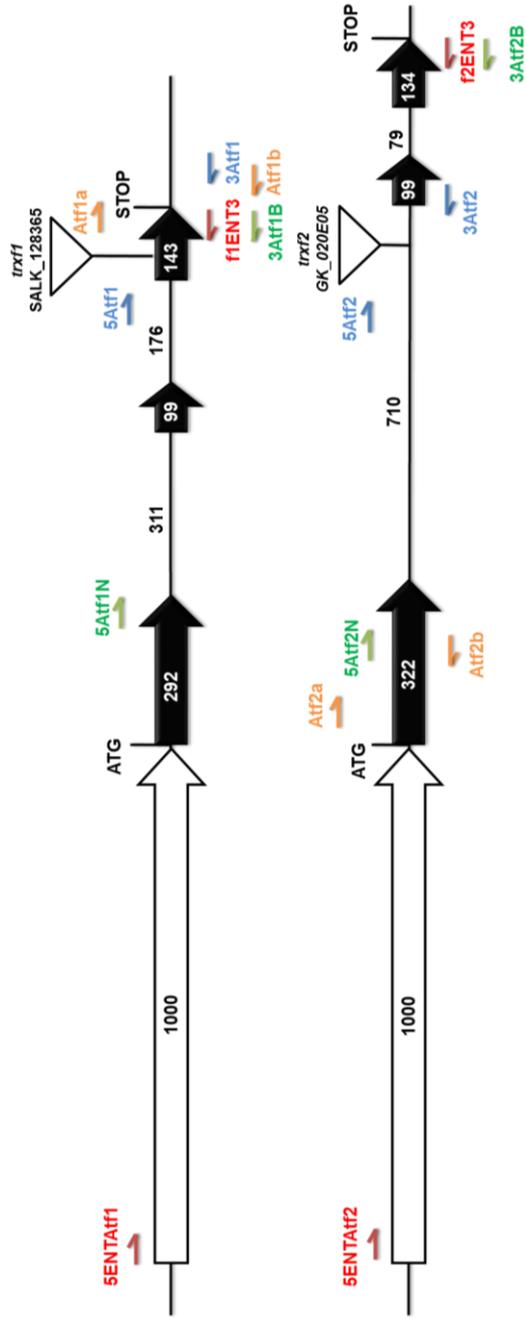


Figura 16.- Representación de los loci correspondientes a los genes *AtTRXf1* y *AtTRXf2*. Se muestran la disposición y tamaños (en pares de bases) de promotores, exones (flechas de trazo grueso) e intrones (trazo fino) de cada gen, así como la posición de la inserción de T-ADN en los mismos. En azul: oligonucleótidos usados para el aislamiento de mutantes; en rojo: oligonucleótidos usados para la clonación de genes; en verde: oligonucleótidos usados para la clonación de los ADNC; en naranja: oligonucleótidos usados en análisis de expresión génica.

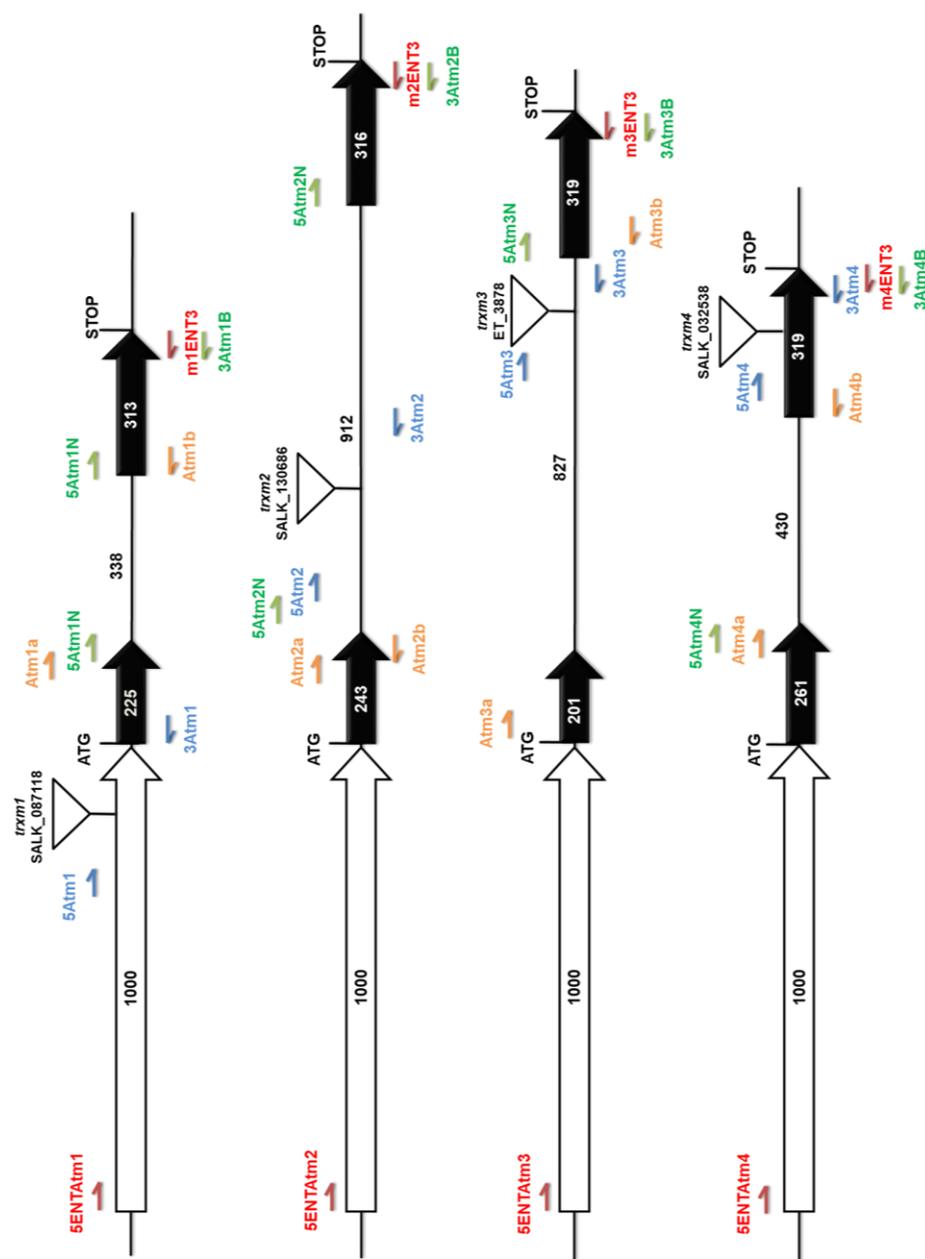


Figura 17.- Representación de los loci correspondientes a los genes *AtTRXm1*, *AtTRXm2*, *AtTRXm3* y *AtTRXm4*. Se muestra la disposición y tamaños (en pares de bases) de promotores, exones (flechas de trazo grueso) e intrones (trazo fino) de cada gen, así como la posición de la inserción de T-ADN. En azul: oligonucleótidos usados para el aislamiento de mutantes; en rojo: oligonucleótidos usados para la clonación de genes; en verde: oligonucleótidos usados para la clonación de transcritos; en naranja: oligonucleótidos usados en análisis de expresión génica.

### **B.3.- Aislamiento de ADN genómico de tejidos vegetales.**

Para la extracción de ADN genómico se usó el kit de “Extracción de ADN genómico de plantas y hongos” (*Real*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **B.4.- Aislamiento de plásmidos.**

Para el aislamiento de plásmidos bacterianos se empleó el método de lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979). A partir de 5 ml de un cultivo líquido saturado se recogieron las bacterias centrifugando durante 5 min a 13000 rpm. El precipitado de células se resuspendió con la ayuda de un vórtex con 100 µl de una solución de Tris-HCl 10 mM a pH 8,0, EDTA 1 mM y ARNasa A 100 µg/ml. A continuación, se adicionaron 100 µl de un tampón de lisis constituido por NaOH 0.2 M y SDS 1% (p/v). La mezcla fue agitada suavemente por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 100 µl de tampón de neutralización frío (acetato potásico 3M a pH 5,5). La mezcla se agitó por inversión suave y se incubó 10 min en hielo. Se procedió a su centrifugación a 13000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio de 1,5 ml, al cual se adicionaron 600 µl de etanol absoluto y fue centrifugado durante 10 min a 13000 rpm para precipitar el ADN. La fase acuosa se decantó y el precipitado fue lavado con 600 µl de etanol al 70%. Nuevamente se volvió a centrifugar durante 10 min a 13000 rpm, el sobrenadante fue retirado y se procedió a evaporar el etanol residual con la ayuda de una estufa a 37 °C. Por último, el plásmido aislado se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O calidad mq.

### **B.5.- Preparación de muestras de tejidos vegetales para análisis genotípicos por PCR.**

Para la preparación de muestras de tejidos vegetales para análisis genotípicos mediante PCR, se utilizó un protocolo adaptado de Kasajima y col., (2004) (Kasajima et al., 2004). Un cotiledón de plántulas de 3-4 días después de la germinación se trituró en tubos tipo *Eppendorf* de 1,5ml con ayuda de un pistilo de vidrio estéril después de añadir 50 µL de tampón compuesto por Tris-HCl 20 mM a pH 7,5, NaCl 25 mM, EDTA 2,5 mM y SDS al 0,05% (p/v). En el caso de plantas adultas la relación usada fue de 1 mg de muestra en 150 µl de tampón de extracción. Para realizar la PCR se añadió 1 µl de extracto en 20 µl de volumen final.

### B.6.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la “Reacción en Cadena de la polimerasa” se realizó en un termociclador modelo “*T-Gradient*” (Biometra). Las condiciones de PCR programadas dependieron de cada experimento, pero siguieron el esquema general detallado en la figura 18. La temperatura de hibridación se fijó en 5 °C por debajo de la temperatura media de hibridación de los oligonucleótidos utilizados para cada experimento. El tiempo de hibridación varió entre 15-30 s, mientras que la extensión en la reacción de PCR se fijó en función del tamaño del fragmento de ADN a amplificar. El número de ciclos se estableció en función del objetivo buscado en cada experimento, oscilando entre los 30 y 40 ciclos.

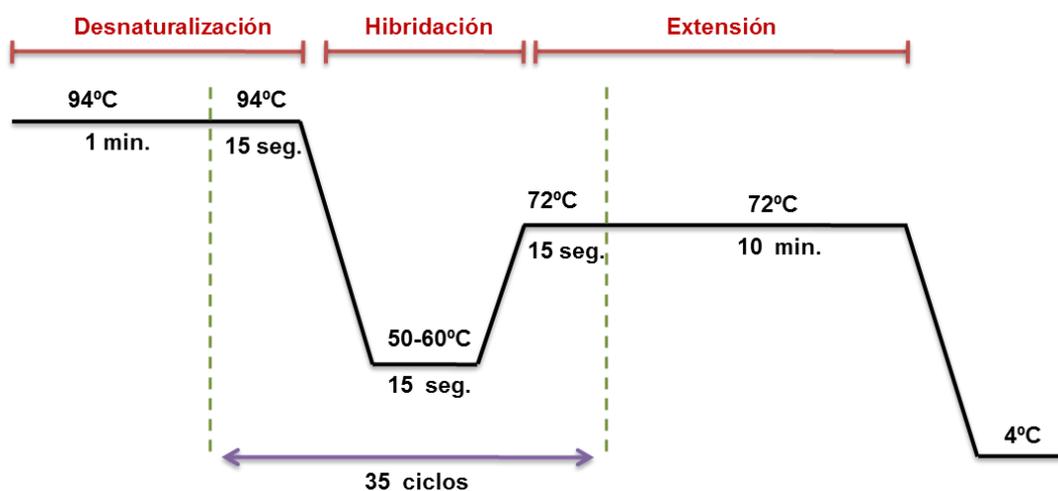


Figura 18.- Esquema general de las etapas de PCR usadas.

De manera rutinaria se usó la polimerasa *MyTaq* (Bioline), mientras que para la clonación de ADNc se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *iProof* (Bio-Rad).

### B.7.- PCR de colonias.

La alta temperatura utilizada en la PCR para desnaturalizar el ADN provoca la lisis de las células bacterianas liberando su contenido intracelular al medio de reacción. Esta técnica se ha utilizado para el análisis de las colonias que crecieron en medios de selección tras una transformación bacteriana. Para ello se realizaba una PCR convencional, donde el molde era una pequeña cantidad de biomasa bacteriana recogida por medio de una punta estéril de micropipeta y resuspendida en un volumen de reacción de 12 µl.

### **B.8.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.**

La separación de fragmentos de ADN por tamaño se realizaba mediante electroforesis en geles de agarosa. El porcentaje (p/v) de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos de ADN que se quisieran separar. La electroforesis se realizaba en cubetas horizontales “*Mupid One*” y “*Mupid 21*” (Advance), donde los geles de agarosa eran sumergidos en tampón TBE 0,5x compuesto por Tris 40 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1mM. Para cargar las muestras en el gel se les añadía tampón de carga 5x, compuesto por glicerol al 50 % (v/v), EDTA 0.1 M y azul de bromofenol al 0.1 % (p/v). Como marcadores de tamaño molecular se utilizó el preparado comercial “*HyperLadder IV*” (Bioline). Para la detección del ADN una vez migrado, los geles eran sumergidos durante 10 min en una solución de “*GelRed*” (Biotium) en H<sub>2</sub>O destilada a una dilución 1:10000. Transcurrido este tiempo, los geles eran visualizados mediante el uso de un equipo “*ChemiDoc Molecular Imager XRS System*” (Bio-Rad) y analizados mediante el software “*Quantity One*” (Bio-Rad).

### **B.9.- Purificación de fragmentos de ADN en agarosa.**

Para la purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa se empleó el kit comercial “*Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification*” (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **B.10.- Restricción de ADN plasmídico.**

Las reacciones de restricción se realizaron en un volumen final comprendido entre 10 y 20 µl, incubando de 100 ng a 500 ng de ADN plasmídico con 3-5 U de la enzima de restricción elegida, en presencia del tampón adecuado. En las reacciones de restricción dobles se usaron tampones de reacción compatibles con las 2 enzimas usadas.

### **B.11.- Ligación de ADN.**

La inserción de fragmentos de ADN en vectores plasmídicos se realizó utilizando la enzima ligasa de ADN del fago T4 (Roche) y su tampón de reacción. Antes de proceder a la ligación, las enzimas de restricción utilizadas para la obtención de los fragmentos se inactivaban calentando la mezcla de digestión a 65 °C para su desnaturalización durante 30 min. Seguidamente se eliminaba el

tampón de digestión de la mezcla gracias al uso de una membrana de diálisis (Millipore) durante 30 min.

En el caso de la ligación de productos de PCR en el vector de clonación pMBL se utilizó la enzima y tampón incluidos en este kit comercial. La ligación entre el fragmento de ADN y el vector se realizó utilizando las proporciones 1:1 a 1:3 (inserto:vector). La incubación de mezcla de ligación tuvo lugar a una temperatura de 12 °C durante toda la noche.

### B.12.- Mutagénesis dirigida mediante PCR.

Para realizar la mutagénesis dirigida se utilizó la técnica de PCR solapante (Ho et al., 1989), descrita brevemente a continuación. Se diseñaron parejas de oligonucleótidos, denominados 5Atf1-CS/3Atf1-CS (TRX*f*1) y 5Atf2-CS/3Atf2-CS (TRX*f*2), que portaban una mutación causante del cambio de Cys por Ser. Además se usaron 2 oligonucleótidos flanqueantes.

Utilizando como molde el ADNc de los genes de ambas TRX*f* se llevaron a cabo 2 series de reacciones de PCR independientes que amplificaron el ADN desde cada uno de los extremos hasta una región de ADN que contenía la mutación (Figura 19).

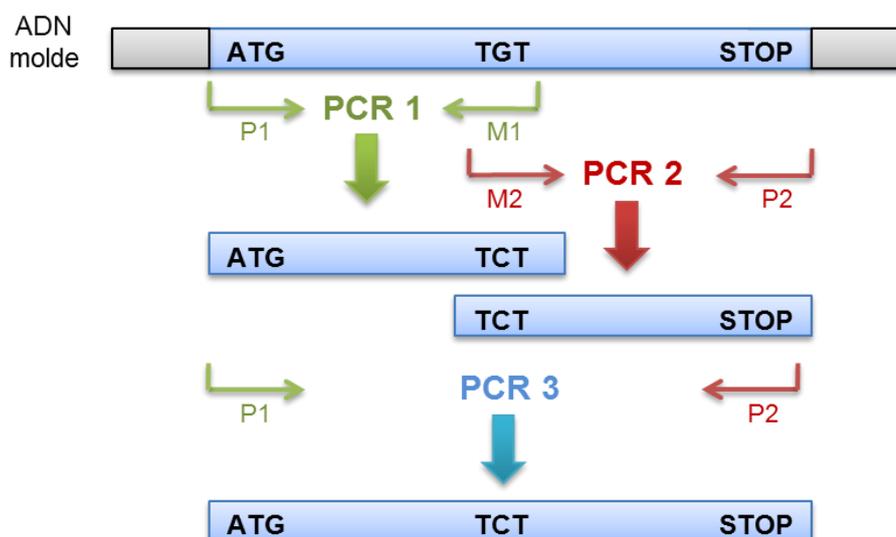


Figura 19.- Esquema general de las reacciones implicadas en el protocolo de mutagénesis dirigida. P1 y P2: oligonucleótidos flanqueantes; M1 y M2: oligonucleótidos internos que contienen la mutación puntual.

Seguidamente se realizó una tercera reacción de PCR usando como moldes la mezcla de ambos amplicones. El producto final se clonó en el vector pMBL para su aislamiento y purificación en *E. coli* Top10.

#### **B.13.- Secuenciación de ADN.**

La secuenciación de ADN fue realizada por el Servicio de Secuenciación de ADN de la Estación Experimental del Zaidín mediante el equipo de análisis “ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer” (Applied Biosystems).

#### **B.14.- Aislamiento de ARN total de tejidos vegetales.**

Para la extracción del ARN procedente de las muestras de guisante y *A. thaliana* se usó el sistema “*Aurum total RNA mini kit*” (Bio-Rad), partiendo de 60 mg de tejido fresco y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como paso previo a la síntesis por retrotranscripción de los ADNc correspondientes a los ARN extraídos, se realizó una reacción de PCR para comprobar que en las muestras no existía contaminación de ADN genómico. Se usaron las parejas de oligonucleótidos At18s-F/At18s-R (para muestras de *A. thaliana*) y Ps18s-F/Ps18s-R (para muestras de guisante), que amplifican el ARN 18S ribosómico que sirve de control interno.

#### **B.15.- Síntesis de ADNc.**

La síntesis de la cadena complementaria de ADN se llevó a cabo usando 100-500 ng de ARN extraído según el protocolo descrito en el apartado anterior. Y constó de dos pasos. En primer lugar se adicionaron al ARN 0,5 µl de oligonucleótidos inespecíficos “*Random Hexamers Primers*” (Qiagen) de concentración 0,4 µg/mL y cantidad suficiente de H<sub>2</sub>O calidad mq para conseguir un volumen final de reacción de 10 µl. La mezcla se incubó a 70 °C por 10 min., y tras esto a 25 °C durante otros 10 min. Finalmente se dejó en hielo 5 min. En una segunda etapa y, mientras las muestras se encontraban en frío, se añadieron 4 µl de buffer de reacción comercial (Roche), 0,6 µl de mezcla de dNTPs (10 mM), 3 µl de DTT (0.1 M) y 0,5 µl (200U) de enzima retrotranscriptasa AMV (Roche). Finalmente la reacción se incubó a 42°C durante 3h. y tras esto a 70 °C por 10 min., con el objeto de inactivar a la AMV.

#### **B.16.- RT-PCR semicuantitativa.**

Para normalizar la cantidad de muestra utilizada en los análisis de PCR-semicuantitativa, se prepararon diluciones de las muestras que se sometieron a la reacción de PCR usando como estándar el gen ribosomal de la subunidad 18S. Para la amplificación del transcrito correspondiente a dicho gen se utilizaron la pareja de oligonucleótidos At18s-F/At18s-R (*A. thaliana*). Los productos de la reacción se verificaron en un gel de agarosa al 1,5% permitiendo determinar las diluciones adecuadas para llevar a cabo las reacciones finales para el estudio de expresión. Mediante estas comprobaciones se estimó el intervalo de ciclos situados en la zona de amplificación exponencial de la PCR antes de llegar a la fase de saturación. La cuantificación y comparación de los productos de PCR permitió determinar la acumulación relativa de los transcritos estudiados en cada órgano o condición analizada.

#### **B.17.- RT-PCR cuantitativa.**

Con el objetivo de medir en tiempo real la amplificación por PCR de los genes de interés, se empleó un equipo “IQ-5 Multicolor Real-Time PCR Detection System” (Bio-Rad). El sistema detecta al fluoróforo “SYBR Green I” unido al ADN formando un complejo que emite una señal fluorescente con máximos de excitación y emisión a 494 y 521 nm, respectivamente, y que es recogida y monitorizada por el detector del equipo, permitiéndonos seguir desde el inicio de la reacción la formación de nuevas moléculas. El fluoróforo forma parte del preparado comercial “SYBR Green Supermix” (Bio-Rad) que además contiene la enzima “iTaQ DNA Polymerase” y todos los componentes necesarios para su funcionamiento. La polimerasa proporciona una alta especificidad y sensibilidad en la reacción de PCR, ya que es suministrada de forma inactiva por el fabricante y es necesaria una incubación previa de 10 min a 95 °C para su activación, de esta forma se previene la formación de productos inespecíficos en fases iniciales de la amplificación. Cada reacción se realizó por triplicado empleando las siguientes condiciones: 2 min a 50 °C, 10 min de activación a 95 °C y 40 ciclos de amplificación (30 s a 95 °C, 30 s a la temperatura de hibridación específica de cada pareja de oligonucleótidos y 30 s a 72 °C), seguidos de la curva de desnaturalización.

La expresión relativa se calculó empleando el método de  $\Delta(\Delta C_t)$ , dónde  $C_t$  (*threshold cycle*), es el valor que representa el número de ciclos en los que la línea de la gráfica intercepta la línea base (Figura 20).

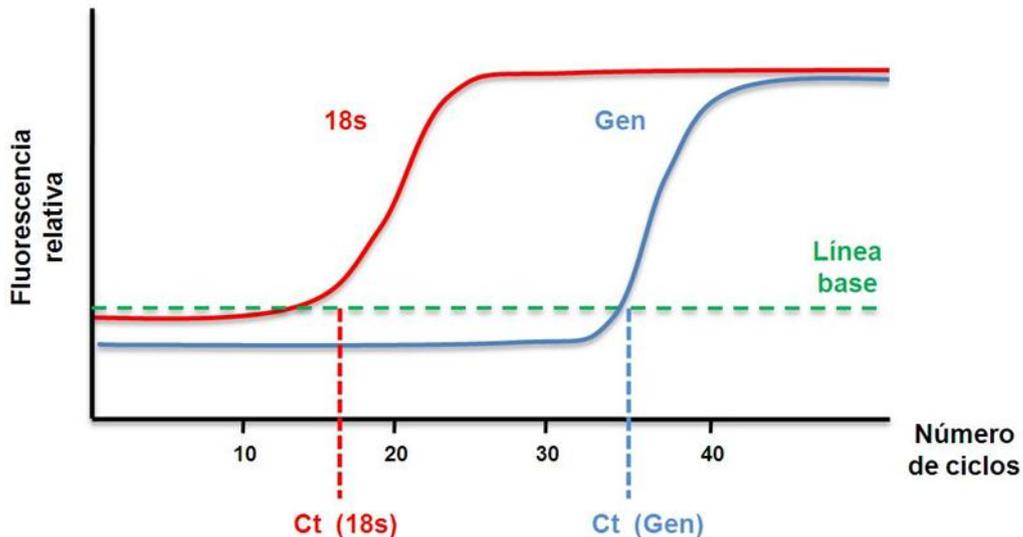


Figura 20.- Obtención del valor de  $C_t$ .

Cuanto más pequeño es el valor de  $C_t$  mas cantidad de molde existe en la mezcla de PCR, es decir, existe una mayor expresión del gen estudiado según la expresión:

$$\text{Amplificación relativa (gen)} = 2^{-[\Delta C_t(\text{gen}) - \Delta C_t(18s)]}$$

Como control interno para normalizar los resultados se utilizó, al igual que en la PCR semicuantativa, el gen del ARNr de la subunidad 18S que, debido a su abundancia, presenta siempre valores de  $C_t$  muy bajos.

## C.- Sección III: Métodos de análisis y manipulación de proteínas.

### C.1.- Aislamiento y cuantificación de proteínas.

#### C.1.1.- Extracción de proteínas vegetales.

Para la obtención de los extractos de proteínas vegetales se maceraron 50 mg de tejido vegetal en un mortero con ayuda de  $N_2$  líquido al que se añadió posteriormente un tampón de extracción de proteínas compuesto por 25 mM Tris-HCl a pH 7,5, 5 mM  $MgCl_2$ , 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF y 50 % de glicerol (v/v).

A continuación, los extractos fueron centrifugados en frío a 13000 rpm durante 10 min tras los cuales se recogían los sobrenadantes separados, que contenían proteínas solubles en suspensión. Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) usando para ello el reactivo “*Bio-Rad Assay Proteín*” (Bio-Rad). Una vez cuantificados, los extractos se conservaron a -20 °C.

### C.1.2.-Extracción de proteínas de levadura.

Para extraer proteínas de células de levadura en primer lugar se puso a crecer un inóculo de levadura en 3 ml de medio mínimo hasta obtener una  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 3 unidades. Este cultivo fue centrifugado a 13000 rpm durante 10 min, obteniéndose un precipitado celular que fue resuspendido en 100  $\mu$ l de un tampón compuesto por 0,1 M Tris-HCl a pH 8,0 y 1 mM PMSF. A esta suspensión le adicionamos 0,5-1 mg de bolas de cristal de 0,45 mm (Sigma) y se sometió a vórtex repetidas veces durante 1 min hasta conseguir la rotura de las células. A continuación se incubaron los extractos en hielo durante 1 min. Adicionalmente el extracto se trató con la enzima liticasa (Sigma-Aldrich) y se agitó 3 veces (1 min por agitación) mediante vórtex, para posteriormente incubar a 37 °C durante 20 min. Para separar el extracto de proteínas de los restos celulares se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se pasó el sobrenadante obtenido a un tubo Eppendorf. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford. Los extractos de proteínas obtenidos se conservaron a -20 °C.

### C.1.3.- Extracción de proteínas vegetales para electroforesis bidimensional.

Para la obtención de extractos de proteínas para su separación por electroforesis bidimensional se siguió el método del TCA/fenol (Wang et al., 2006). A lo largo del protocolo, todas las centrifugaciones se realizaron en las mismas condiciones: 12000 rpm durante 10 min a 4 °C, mientras que la resuspensión de los precipitados se llevó a cabo mediante el uso de vórtex y agitación suave por inversión.

En primer lugar se trituraron 500 mg de hojas de roseta en  $N_2$  líquido en un mortero. Una vez pulverizadas se añadieron 2 ml de TCA al 10% (v/v) en acetona a -20 °C directamente al mortero y se mezcló con el brazo del mortero. El extracto fue transvasado a un tubo de 2 ml donde se agitó con un vórtex y seguidamente

se mezclaban por inversión. Para facilitar la rotura de las células las muestras fueron sonicadas durante 10 s subiendo progresivamente la intensidad hasta aproximadamente el 50% de la intensidad máxima del sonicador. Los extractos fueron centrifugados y el precipitado resultante se resuspendió en 2 ml de 0,1 M acetato amónico en metanol al 80% (v/v) enfriado a -20 °C. Los extractos fueron centrifugados y tras decantar el sobrenadante, el precipitado formado se resuspendió en acetona al 80% (v/v), enfriada a -20 °C. Tras una nueva centrifugación se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente hasta la evaporación de la acetona residual.

A continuación se añadieron 600 µl de un tampón compuesto por Tris-HCl 0,1 M a pH 8,0, sacarosa al 30% (p/v), SDS al 2% (p/v) y β-mercaptoetanol al 5% (v/v), mezclando bien con un vórtex para facilitar su completa disolución. Se añadió fenol a pH 8,0, en una relación de 1:1 con el tampón conteniendo SDS previamente añadido. Tras la resuspensión del precipitado este se incubó durante 5 min en hielo y se centrifugó a 12000 rpm. La fracción superior acuosa se transfirió a un tubo de 2 ml, y se añadió acetato amónico 0,1 M en metanol al 80% (v/v) frío hasta completar un volumen de 2 ml. La solución se dejó precipitar durante toda la noche a -80 °C. Al día siguiente la solución se centrifugó a 12000 rpm. El sobrenadante obtenido fue eliminado y el precipitado se lavó primero con metanol 100% enfriado a -20 °C, y finalmente con acetona fría al 80% (v/v).

Tras una última centrifugación, el precipitado formado se dejó secar y se le añadió 100 µl de medio de resuspensión compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M, 3-[(3-colamidopropyl)dimetilamonio]-1-propanosulfonato(CHAPS) al 4% (p/v), tritón X-100 al 2% (v/v) y DTT 100 mM que fue añadido antes de su uso. El precipitado se solubilizó durante 2 h en agitación y eventualmente por medio de resuspensión con una micropipeta. Las proteínas de los extractos obtenidos se cuantificaron mediante el método de Bradford y se conservaron a 4 °C.

## **C.2.- Separación de proteínas mediante SDS-PAGE.**

Para poder separar las proteínas de los extractos obtenidos se utilizó la técnica de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). En presencia del SDS la mayoría de las proteínas adquieren una relación carga/masa idéntica, por lo que se obtiene un fraccionamiento que obedece a la diferencia de

peso, a la longitud de la cadena (tamaño) y a la forma de la proteína. Para la realización de esta técnica se utilizaron equipos de electroforesis vertical “*Real PAGE mini*” (REAL-Durviz).

A los extractos de proteínas se les añadió 1/5 del volumen a cargar de un tampón de carga concentrado 5x (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, SDS al 2% (p/v), glicerol al 25% (v/v) y azul de bromofenol 0,1 % (p/v)). A continuación, las muestras se calentaron en un baño a 100 °C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas y favorecer la unión al SDS. Se depositaron las muestras en los pocillos localizados en la parte superior de los geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970).

Como referencia para el tamaño de los péptidos se utilizaron los marcadores de masa molecular “*SDS-PAGE Standards, Broad Range*” (Bio-Rad) o los marcadores preteñidos “*Prestained*” (Bio-Rad) en el caso de los geles destinados a *western-blotting*.

Utilizando como fuente de alimentación el modelo “*1000/500 Constant Voltage Power Supply*” (BioRad), las muestras de los geles migraron durante 45 min aproximadamente a un voltaje de 35 V con el objeto de evitar distorsiones y mejorar el empaquetamiento de las bandas de proteínas durante la entrada en el gel. A continuación el voltaje se elevó hasta los 100 V para permitir la separación de las proteínas en base a su tamaño.

### **C.3.- Tinción de proteínas con azul de Coomassie.**

La visualización de las proteínas separadas mediante electroforesis se llevó a cabo mediante incubación de los geles en un tampón compuesto por “*Coomassie Brilliant Blue*” (Sigma-Aldrich) al 0.25 % (p/v), metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), durante toda la noche, en agitación y a temperatura ambiente. El gel se sometió a varios lavados en una solución de decoloración compuesta por metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) para quitar el exceso de tinción hasta la perfecta visualización de las bandas correspondientes a los péptidos separados.

#### **C.4.- Inmunodetección de proteínas mediante la técnica de *western-blotting*.**

##### C.4.1.- Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.

Al finalizar la electroforesis, el gel se sumergía en el tampón de transferencia TGM constituido por Tris 48 mM, glicina 29 mM, SDS al 0,037 % (p/v) y metanol al 15 % (v/v) durante 15 min. Simultáneamente se preparó una membrana de nitrocelulosa 6 piezas de papel *Whatman* 3MM de dimensiones idénticas a las del gel. Sobre 3 piezas de papel *Whatman* humedecidas en tampón de transferencia TGM se colocó la membrana de nitrocelulosa sumergida en el tampón de transferencia durante unos segundos. A continuación se depositó el gel de poliacrilamida en la posición y orientación adecuada, y finalmente se colocaron las otras 3 piezas de papel *Whatman* restantes. Todo el montaje fue colocado en la plataforma del equipo de transferencia semi-húmedo "*Trans-Blot turbo*" (Bio-Rad) para someterlo durante 30 min a un voltaje máximo de 25 V y a una intensidad de corriente resultante de la siguiente expresión:

$$\text{Corriente (mA)} = \text{superficie (cm}^2\text{)} \times \text{número de membranas} \times 0,8$$

##### C.4.2.- Incubación con anticuerpos.

Al finalizar la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con solución de rojo Ponceau (1 g de colorante en 1 ml de ácido acético diluido hasta 100 ml con agua destilada) para comprobar la transferencia homogénea por toda la membrana de nitrocelulosa. Se eliminó el exceso de colorante mediante varios lavados con agua destilada y para evitar la unión de anticuerpo a otras regiones de la membrana se bloqueó con una solución conteniendo 5% (p/v) de leche en polvo en tampón TBS (Tris-HCl 0,1 M a pH 7,5 y NaCl al 0,9% (p/v)), durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó la membrana tres veces durante 5 min con tampón TBST (TBS con Tween-20 al 0,1 % (v/v)) y se incubó la membrana con una solución en TBS de anticuerpos primarios específicos para cada una de las proteínas en estudio. En la tabla 6 se muestran ordenados los anticuerpos usados y las diluciones a las que fueron utilizadas.

La incubación con el anticuerpo primario se realizó toda la noche a 4 °C y con agitación. Tras la incubación se lavó la membrana tres veces con TBST y posteriormente se incubó con una dilución 1:10000 en TBS de un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con la enzima peroxidasa HRP

(Sigma-Aldrich). También fueron usados anticuerpos conjugados con peroxidasa procedentes de ratón (1:2500) y cabra (1:10000) que reconocían anticuerpos primarios frente GFP y RUBISCO activasa, respectivamente. La incubación con el anticuerpo secundario fue de 2 h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con TBST y uno con TBS para eliminar restos de anticuerpos, la membrana se reveló mediante quimioluminiscencia.

Anticuerpo	Masa molecular	Organismo	Dilución
TRX <i>m1</i>	14 kDa	<i>Pisum sativum</i>	1:500
TRX <i>f</i>	14 kDa	<i>Pisum sativum</i>	1:250
cFBP1	45 kDa	<i>Pisum sativum</i>	1:2000
cyFBP	37 kDa	<i>Pisum sativum</i>	1:2000
GFP	27 kDa	<i>Aequorea victoria</i>	1:10000
2- Cys PRX	29 kDa	<i>Pisum sativum</i>	1:1000
SRX	14 kDa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1:1000
RUBISCO Activasa	28 kDa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1:500
PsbD	28/30 kDa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1:2000
PsbO	33 kDa	<i>Nicotiana benthamiana</i>	1:10000
PsbP	23 kDa	<i>Nicotiana benthamiana</i>	1:1000
PsbQ	16 kDa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1:1000
PsbS	22 kDa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1:1000

Tabla 6.- Anticuerpos policlonales primarios y diluciones correspondientes.

#### C.4.3.- Revelado de membranas.

La solución de revelado se preparó disolviendo en 20 ml de tampón de luminol (Tris-HCl 50 mM a pH 8,6 y NaCl 150 mM), 100 µl de luminol 80 mg/ml en DMSO (Applichem), 40 µL de solución de 4-Yodo-fenol a 50 mg/ml en DMSO y 3,4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33 % justo antes del revelado. Las imágenes de las membranas fueron capturadas mediante el uso de un equipo “ChemiDoc Molecular Imager XRS System” (Bio-Rad) y analizadas mediante el software “Quantity One” (Bio-Rad).

#### **C.5.- Electroforesis bidimensional.**

Esta técnica fue realizada por la Unidad de Proteómica de la Universidad de Córdoba integrada dentro de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI). Para ello los extractos vegetales se prepararon según el protocolo descrito en el apartado C.1.3. de esta Sección. En primer lugar se produce la separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico (pI) mediante un

isoelectroenfoque (IEF) en gel con gradiente de pH y posteriormente hay una separación por su masa molecular mediante una electroforesis en gel SDS-PAGE. La tinción de los geles se llevó a cabo mediante el uso del colorante azul de Coomassie. Con el programa PDQuest se seleccionaron los péptidos cuya intensidad variaba con respecto al control (WT), los péptidos teñidos (*spots*) se aislaron del gel mediante el uso de un robot y se fueron analizadas mediante espectrometría de masas por la misma Unidad de Proteómica de la Universidad de Córdoba.

### C.6.- Análisis de péptidos por espectrometría de masas.

El análisis de las péptidos aislados fue realizado en el equipo “4700 *Proteomics Analyzer*” (Applied Biosystems) perteneciente a la Unidad de Proteómica de la Universidad de Córdoba. Este sistema está compuesto por una fuente de iones que genera e ioniza las muestras a analizar en el instrumento. En este caso se trata de ionización MALDI (*Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Esta fuente de ionización está asociada a un analizador de tiempo de vuelo “TOF” (*Time of flight*) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados mediante un campo eléctrico.

La recogida de los *spots* en los geles bidimensionales se llevó a cabo mediante una estación automática *ProPic* (Genomics Solutions). A continuación se procedió a la digestión de las mismas usando tripsina porcina. Esta digestión generó un conjunto de péptidos de menor tamaño para poder ser analizados por espectrometría de masas mediante la técnica de “identificación de proteínas mediante huella peptídico MS-MS/MS” (MALDITOF-TOF). En este proceso los péptidos resultantes de la digestión de proteínas se depositaron sobre una placa MALDI para su análisis mediante espectrometría de manera que se obtuvo un espectro de masas (MS) denominado “huella peptídica” y los espectros de fragmentación (MS/MS) de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las “huellas peptídicas”. La identificación de proteínas se realizó mediante el sistema “GPS” (*Global Protein Server*) acoplado a los datos del TOF-TOF, combinando los espectros MS-MS/MS obtenidos para cada muestra y usando como motor de búsqueda “MASCOT” (Matrix Science) sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas.

## C.7.- Técnicas de cromatografía de afinidad.

### C.7.1.-Purificación de proteínas obtenidas por sobre-expresión heteróloga.

Las cepas de *E. Coli* BL21 transformadas con las plásmidos derivados de pET28b fueron cultivadas en 150 mL de medio LB con kanamicina 50 µg/mL. El cultivo se incubó toda la noche en agitación a 37 °C hasta saturación y se utilizó para inocular un volumen mayor de 3 litros de LB con kanamicina 50 µg/ml, incubando a 37 °C y en agitación hasta que se alcanzó una turbidez de 0.5-0.6 a 600 nm. En este punto (fase exponencial de crecimiento) se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG hasta una concentración final de 0,4 mM, manteniendo el cultivo a 37 °C en agitación durante 4 h más. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min y el precipitado obtenido se resuspendió en un volumen de 10 ml de tampón de lisis compuesto por tampón fosfato sódico 20 mM a pH 7,4, imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, glicerol al 10% (v/v) y 0,5 mg de inhibidores de proteasa (*Complete EDTA Free Tablets*; Roche). La rotura de las células se provocó gracia al uso de un sonicador mediante 4 ciclos de 30 s al 50% de la intensidad máxima del aparato, dejando 1 min entre cada ciclo, el extracto se mantuvo en todo momento en hielo. El producto de la sonicación se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm y el sobrenadante, que contenía el extracto de proteínas solubles, se separó del precipitado, compuesto por restos celulares y agregados proteicos insolubles.

Para la purificación de las proteínas sobre-expresadas, el equipo utilizado fue el sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas “*Fast Protein Liquid Chromatography*” (FPLC) modelo *ÄKTA* (Amersham Bioscences) compatible con las columnas de cromatografía de níquel, de afinidad por His “*HisTrap FF Crude*” (GE Healthcare). Se utilizaron columnas de 1 ml manufacturadas. El uso del vector pET28b permite expresar proteínas de fusión a 6 histidinas en el extremo amino de los péptidos, facilitando su purificación por este sistema. Antes de cada purificación, para el lavado y activación de las mismas, las columnas fueron tratadas pasando varias soluciones a través de ellas en el siguiente orden: 10 ml de agua destilada, 2 ml de AcNH<sub>4</sub> 100 mM a pH 4,0, 2 ml de una solución 10 mM de NiCl<sub>2</sub> y 100 mM de AcNH<sub>4</sub> a pH 4,0 (mantenida en la columna durante 5 min), 2 ml de AcNH<sub>4</sub> 100 mM a pH 4,0 y por último 5 ml de tampón de unión compuesto

por 20 mM de tampón fosfato sódico a pH 7,4, 20 mM de imidazol, 500 mM de NaCl y 10% (v/v) de glicerol.

El extracto de proteínas fue cargado en la columna a una velocidad de entrada de 1 ml/min. A continuación se lavó la columna con 5 ml de tampón de unión antes de la elución. La elución de la proteína que está unida a la matriz se realizó haciendo pasar por la columna un tampón de elución compuesto por fosfato sódico 20 mM a pH 7,4, imidazol 500 mM, NaCl 500 mM y glicerol al 10% (v/v). Finalmente, se lavó la columna haciendo pasar 2 volúmenes de EDTA 100 mM, seguidos de 6 volúmenes de agua destilada y 2 volúmenes de etanol al 20%, manteniendo la columna a 4 °C hasta la siguiente purificación. Al finalizar el proceso de purificación de las proteínas, estas fueron migradas en un gel SDS-PAGE al 15% y teñidas con azul de Coomassie para comprobar el grado de pureza.

#### C.7.2.-Búsqueda de dianas de tiorredoxinas en extractos de Arabidopsis.

En primer lugar, y mediante el uso del equipo de FPLC, se cargaron en columnas de 100 µl no comerciales que contenían la matriz con Ni<sup>2+</sup> de afinidad por His (GE Healthcare) 200 µg aproximadamente de la proteína purificada de interés previamente dializada siguiendo los mismos pasos que para la purificación pero sin la elusión final. A continuación se procedió a la obtención del extracto de interés que se quería pasar por la columna. Para ello, las muestras fueron congeladas con N<sub>2</sub> líquido, trituradas en mortero hasta pulverizarlas para luego añadir 4 ml de un tampón compuesto por fosfato sódico 20 mM a pH 7,4, NaCl 50 mM, glicerol al 10% (v/v) y 20 mg de un cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche). El extracto obtenido se hizo circular por la columna de manera continuada durante toda la noche a una temperatura no superior a 6 °C y con la ayuda de una bomba peristáltica que mantenía el flujo a una velocidad de 2 ml/min. Al día siguiente se procedió a un primer lavado de la columna con 2 ml del tampón de extracción y a un segundo lavado con 2 ml de una solución fosfato sódico 20 mM a pH 7,4, NaCl 500 mM y glicerol al 10% (v/v). Finalmente, se añadieron 2 mL de tampón de elución (fosfato sódico 20 mM a pH 7,4, imidazol 500 mM, NaCl 500 mM y glicerol al 10% (v/v), tras el cual eluyeron tanto los complejos TRX-diana como la TRX no unida a dianas. Las fracciones con proteína

fueron sometidas a electroforesis en gel de SDS-PAGE al 15% y analizadas mediante tinción con plata.

### C.8.- Determinaciones enzimáticas.

#### C.8.1.- Activación de la FBPasa cloroplastídica.

Para estudiar la capacidad de activación de las TRXs f y m sobre la FBPasa, se siguió un protocolo adaptado de Prado et al., 1992 . La activación se llevó a cabo en una solución conteniendo 100 mM Tris-HCl a pH 8, 0,1 mg/ml de cFBP1 de Arabidopsis o guisante, 0,1 mM DTT y TRX a una concentración de hasta 5  $\mu$ M. Las mezclas de activación se incubaron a temperatura ambiente (aprox. 22°C) durante 30 min. Transcurrida la fase de activación, la mezcla se pasa a un pocillo de una placa microtiter conteniendo previamente. Como el DTT también puede reducir directamente a la FBPasa, se realizó un control de activación sin TRX.

Para determinar la actividad FBPasa se utilizó una modificación del protocolo descrito por Lázaro y col. (Lázaro et al., 1974). La reacción enzimática se llevó a cabo en 200  $\mu$ l de una solución compuesta por 50 mM Tris-HCl a pH 8,0, 0,75 mM  $MgCl_2$ , 0,6 mM fructosa-1,6-bisfosfato (FBP),  $NADP^+$  0.3 mM, 1,4 U de PGI y 0,7 U de G6PDH, iniciándose la reacción enzimática inmediatamente después de añadir el sustrato FBP. Se midió el incremento en la absorbancia a 340 nm producido por la aparición de NADPH en una serie de reacciones llevadas a cabo por las enzimas auxiliares PGI y G6PDH, tal y como se describe en la figura 21.



Figura 21.- Reacciones llevadas a cabo para ensayo enzimático de actividad FBPasa. PGI, Fosfoglucoisomerasa; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa).

La cantidad de NADPH que se determina es equivalente a la de fructosa-6-fosfato producido por la desfosforilación de la FBP por la FBPasa. La mezcla de reacción contenía los componentes descritos en la tabla 7. Las determinaciones se realizaron en un lector de placas Sunrise (TECAN).

Compuesto	Concentración final
Tris HCl, pH 8.8	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
NADP	0,3 mM
G6PDH	0,14 U
PGI	0,28 U
FBP	0,6 mM
Extracto de proteínas	10 µg.ml <sup>-1</sup>

Tabla 7.- Componentes de la solución de reacción para la determinación enzimática de la FBPasa.

#### C.8.2.- Ensayo de reducción de insulina por TRXs.

Para comprobar si las proteínas recombinantes purificadas presentaban actividad reductasa se utilizó el método de reducción de insulina (Holmgren, 1979). El ensayo se realizó midiendo con un lector de placas la turbidez a 600 nm por la precipitación de la insulina reducida. La reacción se llevó a cabo en una solución conteniendo tampón fosfato 100 mM a pH 7,0, EDTA 2 mM, insulina (0,5 mg/ml) y una concentración 5 µM de las distintas isoformas de las TRXs. La reacción se inició añadiendo DTT a una concentración final de 0,5 mM.

## D.- Sección IV: Métodos de transformación genética.

### D.1.- *Escherichia coli*.

#### D.1.1.- Preparación y transformación de *E. coli* Top10 mediante electroporación.

La preparación de células electrocompetentes de *E. coli* Top10 se llevó a cabo con células cultivadas en medio LB en fase exponencial (turbidez<sub>600</sub> de 0.5-0.6. Tras enfriarse 10 min en hielo, las células se recolectaron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C y se lavaron 3 veces: 2 de ellas con 20 ml con H<sub>2</sub>O destilada fría y una vez con 10% (v/v) glicerol en H<sub>2</sub>O destilada fría. Finalmente, las células electrocompetentes fueron resuspendidas en 3 ml de glicerol al 10% (v/v) en H<sub>2</sub>O destilada fría, y repartidas en alícuotas de 50 µl en viales que se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación por electroporación se siguió el protocolo de Miller y col. (1988) (Miller et al., 1988). Se mezclaban 50 µl de células electrocompetentes con un volumen de 1 a 10 µl del plásmido previamente dializado para eliminar restos de iones en filtros de policarbonato Isopore (Millipore) de 0,1 µm de poro.

La suspensión celular era incubada durante 1 min en hielo y se pasaba a una cubeta de electroporación “*Cell Projects*” (Bio-Rad) de 0,2 mm de hendidura, previamente enfriada en hielo. En estas condiciones la cubeta se sometió a un pulso eléctrico de 2,5 kV y 15  $\mu$ F, mediante el uso de un electroporador “*MicroPulser Electroporation Apparatus*” (Bio-Rad). Inmediatamente después del pulso se adicionó 1 ml de LB y las células se transfirieron a un tubo de 1,5 ml. Las bacterias transformadas se incubaron durante 1 h a 37 °C con agitación suave y por último se sembraron en placas Petri que contenían LB-agar con los antibióticos adecuados. El crecimiento de las colonias transformadas se observó tras la incubación de las placas a 37 °C durante toda la noche.

#### D.1.2.- Preparación y transformación de células BL21 mediante choque térmico.

La preparación de células BL21 competentes se inició con un precultivo de 150 mL de medio LB sin antibiótico a 37 °C y en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon 3 litros de medio LB con este precultivo. Cuando el medio de cultivo alcanzó una turbidez a 600 nm de 0,5-0,6, se recolectaron las células centrifugando a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C. El precipitado obtenido fue resuspendido en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío y se dejaron las células en dicha solución durante 30 min. Se volvió a centrifugar la suspensión de bacterias a 5000 rpm durante 10 min y se resuspendió el precipitado bacteriano en 4 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío con glicerol al 15% (v/v). Se prepararon alícuotas de 100  $\mu$ l de las células competentes obtenidas en tubos de 1.5 ml y se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Los viales se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación bacteriana por choque térmico se mezcló el contenido de un vial (100  $\mu$ l de suspensión de células competentes) con un volumen de 1 a 10  $\mu$ l de plásmido. La suspensión celular se incubó en hielo 10 min y a continuación se calentó a 42 °C durante 1 min y 30 s (choque térmico), tras lo que se añadió 1 mL de LB a la mezcla y se incubó a 37 °C en agitación durante 1 h. Por último, las células se sembraron en placas de Petri que contenían medio LB-agar con el antibiótico de selección. El crecimiento de las bacterias transformadas se observó tras la incubación a 37 °C durante toda la noche.

## **D.2.- *Agrobacterium tumefaciens*.**

### D.2.1- Preparación y transformación de la cepa GV310 de *A. tumefaciens* mediante electroporación.

Para la preparación de células competentes de *A. tumefaciens* y su consiguiente transformación por electroporación se siguió un protocolo similar al descrito para las células de *E. coli* Top10 con algunas modificaciones (Mattanovich et al., 1989). El protocolo comenzó con la inoculación de 3 litros de LB con 150 mL de un cultivo saturado de *A. tumefaciens*. El cultivo se incubó a 28 °C con agitación durante 4 h hasta que alcanzó una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5-0,6. En este punto el cultivo fue enfriado en hielo durante 10 min para detener su crecimiento. Las células se recogieron mediante centrifugación a 5000 rpm y 4 °C durante 5 min y se lavaron 3 veces con 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril fría y una vez con glicerol al 10% (v/v) en H<sub>2</sub>O destilada estéril y fría. Finalmente, tras una última centrifugación, las células recogidas se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10 % (v/v) en H<sub>2</sub>O destilada estéril y fría, y se distribuyeron en alícuotas de 100 µl en viales estériles y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación de células de *A. tumefaciens* por electroporación se siguió un protocolo similar al descrito para las células de *E. coli* electrocompetentes. Tras la electroporación, se añadió 1 ml de LB y se pasó el contenido de la cubeta a un tubo de 1.5 ml. La suspensión celular se incubó durante 2 h a 28 °C con agitación suave y se sembró en placas de Petri que contenían LB sólido con los antibióticos de selección (gentamicina 20 µg/mL para la cepa, y los correspondientes para cada plasmido transformante). Las bacterias transformadas formaron colonias visibles a partir de las 48 h de incubación a 28 °C.

## **D.3.- *Saccharomyces cerevisiae*.**

### D.3.1.-Preparación y transformación de *S. cerevisiae*.

La preparación de las células de levadura comenzó con un precultivo de 100 µl en medio líquido completo YPDA que se mantuvo en agitación a 28 °C durante la noche para alcanzar la fase de saturación. Con este cultivo saturado se inocularon 10 ml de medio líquido YPDA que se mantuvo incubando durante toda la noche a 28 °C en agitación hasta obtener una D.O.<sub>600nm</sub> de aproximadamente

uno. Las células fueron recogidas mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y lavadas en 1 ml de agua destilada. Tras una nueva centrifugación las células fueron resuspendidas en 1 ml de solución A (acetato de litio 100 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 7,5 y 1 mM de EDTA). Posteriormente se volvió a repetir el paso de centrifugación y resuspensión, esta vez en 50 µl de solución A.

Para la transformación, a 50 µl de levaduras competentes se añadieron 50 µg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado durante 20 min a 100 °C, 1 µg de plásmido y 300 µl de solución B (solución A con 50% (v/v) de PEG 4000). La mezcla fue incubada en agitación durante 30 min a 28 °C para posteriormente someterla a un choque térmico de 15 min a 42 °C. A continuación, las células fueron centrifugadas durante 15 s a 13000 rpm. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de YPDA y se incubó en agitación durante 1 h a 28 °C. Las células se lavaron dos veces con 1 ml H<sub>2</sub>O calidad mq, tras lo cual, las células transformadas se sembraron en medio mínimo SD-agar suplementado con 20 mg/l de adenina (Applichem), 20 mg/l de histidina (Sigma-Aldrich), 50 mg/l de lisina (Sigma-Aldrich) y 20 mg/l de metionina (Sigma-Aldrich). Las colonias aparecieron a partir de las 48 h de incubación a 28 °C.

#### **D.4.- Crio-conservación de cepas bacterianas.**

El cultivo bacteriano se incubó a la temperatura indicada para el crecimiento de las células y en agitación durante el tiempo necesario para alcanzar la saturación. Al cultivo se le añadió glicerol hasta una concentración final del 15% y se conservó en alícuotas en crio-tubos estériles. Tras enfriarlos rápidamente en N<sub>2</sub> líquido se guardaron a -80 °C hasta su uso.

#### **D.5.- *Arabidopsis thaliana*.**

##### D.5.1.-Transformación de *A. thaliana* mediante inmersión floral.

La transformación se llevó a cabo siguiendo una modificación del método de inmersión floral (Clough and Bent, 1998) . Las plantas de *A. thaliana* que iban a ser transformadas se cultivaron en condiciones de día largo (16 h luz / 8 h oscuridad) hasta que las inflorescencias primarias tenían unos 5 cm de longitud, momento en el cual eran cortadas para favorecer la aparición de inflorescencias secundarias. Dos días antes de la transformación, se inoculaba con una colonia

de *A. tumefaciens* portadora del plásmido que se deseaba transferir a la planta en 50 ml de medio YEBS (ajustado el pH a 7,0) compuesto por 1 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de extracto de ternera, 5 g/l de sacarosa, 5 g/l de bactopectona y 0,5 g/l de sulfato de magnesio. Este medio fue suplementado con el antibiótico de resistencia de la cepa (gentamicina 20 µg/ml) y el antibiótico de resistencia para el plásmido a la concentración adecuada.

El preinóculo se incubó a 28 °C y en agitación durante 10-12 h momento en el que alcanzaba la saturación y se utilizó para inocular otros 250 ml de YEBS con antibióticos. Este cultivo se dejaba crecer a 28 °C en agitación durante toda la noche. Una vez alcanzada la fase de saturación, al medio de cultivo se le añadió 100 µl de Silwet L-77 para romper la tensión superficial de la solución y favorecer la entrada de la bacteria en la planta. Las inflorescencias de las plantas eran entonces sumergidas en esta suspensión bacteriana durante aproximadamente 30 s y, a continuación, se secaban suavemente con papel secante y se introducían en cajas de poliestireno con 1 cm de agua (aproximadamente) en el fondo, manteniéndolas en oscuridad, para alcanzar así un alto porcentaje de humedad durante las 24 h a 22 °C que duraba la incubación. Pasado este tiempo, las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento a 22 °C de temperatura, con un fotoperiodo de día largo y una intensidad lumínica de 120 µmol de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> hasta que las silicuas llegaron a la madurez y se pudo proceder a la recolección de las semillas.

#### D.5.2.-Selección de plántulas transformadas.

Las primeras semillas transformadas sembradas en medio de selección que mostraron resistencia al antibiótico fueron consideradas la línea F0 y se sembraron en alvéolos que contenían turba vegetal. Las semillas obtenidas de estas primeras líneas se sometieron de nuevo a un proceso de selección en *in vitro* en medio MS con kanamicina 50 µg/mL. Las semillas que germinaron en este segundo proceso de selección se denominaron líneas F1. Esta ronda de selección se repitió con las líneas que mostraron una relación entre plántulas no resistentes y resistentes de 1:4 (F1), ya que líneas con una tasa de supervivencia superior indica un número de inserciones >1, que fueron desechadas. En una nueva ronda de selección, las semillas de las líneas seleccionadas (F<sub>2</sub>) que presentaban una resistencia del 100% al antibiótico fueron consideradas como líneas homocigotas.

#### D.5.3.-Cruzamiento de líneas de Arabidopsis.

Para el cruzamiento de dos líneas de Arabidopsis se seleccionaron las plantas parentales en un estado fenológico con tallos florales de aproximadamente 10 cm de longitud. Las flores que iban a ser utilizadas como receptoras estaban en un estadio temprano de su desarrollo con estambres inmaduros no dehiscentes, ya que *A. thaliana* es una planta hermafrodita y sus flores se autofecundan antes de abrirse. Dichas flores fueron desprovistas de sépalos, pétalos y estambres con ayuda de pinzas de punta fina y lupa. Por otro lado, se seleccionó un individuo perteneciente a otra línea parental para cortar un estambre dehiscente con polen adherido al mismo, de una de sus flores. Finalmente el estambre de las flores donadoras del polen fue utilizado para fecundar a la flor receptora mediante contacto físico de la antera y el estigma, comprobando la deposición de granos de polen sobre el estigma mediante la visualización a la lupa.

Las semillas procedentes de los cruces se sembraron en medio MS con los antibióticos de selección apropiados y la posición de los T-DNAs fue verificada mediante análisis genotípicos por PCR.

### **E.- Sección V: Métodos de caracterización fisiológica.**

#### **E.1.- Caracterización *in vitro*.**

##### E.1.1.- Respuesta de plántulas de guisante a la salinidad.

Para analizar la respuesta de plántulas de guisante al estrés salino se depositaron semillas de guisante en el fondo de placas Petri cubierto con 3 láminas de papel de filtro estéril. Estas láminas fueron embebidas bien en H<sub>2</sub>O estéril (control, sin tratamiento), o bien en soluciones de NaCl a concentraciones de 50 mM y 150 mM. Pasados los correspondientes tiempos de tratamiento se procedió a la recolección de las muestras. Las plántulas de guisante se diseccionaron mediante el uso de un bisturí en tallo, raíz y cotiledón. El material fue inmediatamente congelado en N<sub>2</sub> líquido y conservado a -80 °C hasta su análisis.

### E.1.2.- Caracterización de *A. thaliana*.

#### - Análisis de germinación.

Para el estudio de la germinación de *A. thaliana* bajo condiciones de estrés, se sembraron aproximadamente 90 semillas (3 réplicas de 30 semillas) en cajas de Petri cuadradas (12 x 12 cm) que contenían medio MS. Se observó el desarrollo de la germinación de las semillas en los primeros días en la cámara de cultivo. El porcentaje de germinación se determinó calculando el ratio de semillas germinadas con respecto al número total de semillas sembradas.

#### - Efecto de diferentes tipos de estrés en el crecimiento.

Para los estudios de crecimiento en condiciones de estrés las semillas, una vez esterilizadas, fueron sembradas en placas de Petri que contenían medio MS. Tras permanecer 5-6 días en la cámara de crecimiento *in vitro*, un grupo de las plántulas germinadas fueron transferidas a placas que contenían medio MS suplementado con 100 mM NaCl y 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Otro grupo de plántulas fue sometido a tratamientos de frío (10 días a 8 °C) y choque térmico (3 horas a 37 °C).

#### - Efecto de los azúcares en el crecimiento de la raíz.

Para los estudios de crecimiento de la raíz se sembraron semillas esterilizadas en el primer tercio de placas de Petri cuadradas que contenían medio MS y medio MS suplementado con distintos azúcares al 6% (p/v) (sacarosa, fructosa, glucosa y manitol). Estas placas fueron colocadas en posición vertical respecto a la horizontal dentro de la cámara de cultivo. Se midió la longitud de las raíces cada 5 días, durante 25 días.

### E.1.3.- Caracterización de los cultivos de levadura.

Los estudios de cultivo *in vitro* de levadura se centraron en la realización de experimentos de complementación heteróloga. Para ello se emplearon 2 metodologías diferentes. En primer lugar se realizaron experimentos de halo de inhibición con NaCl. Se prepararon cajas de Petri con medio mínimo SD-agar que fueron sembradas con 100 µl de cultivo de cada una de las líneas con una densidad de 10<sup>6</sup> células ml<sup>-1</sup>. Tras esto se depositó sobre la superficie sembrada

un disco de papel secante estéril humedecido con una solución de NaCl 5 M. Los halos de inhibición provocados en el cultivo pudieron observarse tras incubar las placas durante 48-72 h a 28 °C. También se llevó a cabo la siembra de diluciones seriadas de levadura en gotas de 7 µl sobre el medio de cultivo. En este caso se utilizaron placas cuadradas que contenían medio sólido SD-agar con distintas concentraciones de NaCl y tBHP (terc-butilo hidroperóxido). Una vez las gotas se habían secado, las cajas fueron incubadas a 28 °C durante 48-72 h

## **E.2.- Caracterización de plantas de *Arabidopsis* sembradas en tierra.**

### E.2.1.- Curvas de crecimiento.

Para la realización de las curvas de crecimiento, se utilizaron plantas de *A. thaliana* mantenidas bajo las condiciones descritas en la Sección I para el cultivo en tierra. Cada 5 días se tomaron 4-5 plantas, con cuyos valores obtenidos se calculó la media y su desviación estándar. El primer punto de muestreo se tomó aproximadamente 5 días después de la siembra mientras que el último se realizó a los 30 días. El muestreo consistió en determinar el peso fresco de la roseta mediante una balanza de precisión, contar el número de hojas en la roseta y determinar el área foliar mediante el escaneo de las muestras y la utilización del programa de análisis de imagen “Photoshop CS5®” (Adobe).

### E.2.3.- Crecimiento en condiciones de alta intensidad lumínica.

Para los estudios de estrés lumínico se utilizaron plantas de *A. thaliana* mantenidas bajo las condiciones descritas en la Sección I para el cultivo en tierra. Tras 25 días de crecimiento, las plantas fueron sometidas a distintos tratamientos de alta intensidad lumínica (600 µmoles de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR) en condiciones de día largo y frío o bajo condiciones de luz continua.

## **E.3.- Tinción de hojas con lugol.**

Para la visualización del almidón en hojas, se introdujeron 3 rosetas por línea en frascos estériles de 40 ml a los que se había añadido una solución de lugol (Sigma-Aldrich). Para poder observar mejor la tinción se había eliminado previamente la clorofila presente en las hojas mediante incubación a 37 °C con etanol al 70%. Cuando las hojas se despigmentaron se eliminó el etanol, se lavó con H<sub>2</sub>O destilada y se procedió a la tinción tal y como se ha indicado

anteriormente. El lugol es un compuesto yodado ( $I_2$  y ioduro potásico de color azul violáceo) que se une a las hélices formadas por las cadenas de glucosa. Las hojas se incubaron a temperatura ambiente hasta observar una coloración marrón oscura (5-10 min). Posteriormente se retiró el lugol y se lavaron varias veces las hojas con  $H_2O$  destilada hasta obtener el característico azul violáceo.

#### **E.4.- Extracción de azúcares solubles y almidón.**

En primer lugar se pesaron 50-100 mg de hojas de roseta que fueron pulverizadas en  $N_2$  líquido y posteriormente maceradas en mortero, para luego añadir 450  $\mu$ l de tampón de extracción (etanol 80% (v/v) diluido en HEPES-KOH 10 mM, pH 7,5).

La suspensión se pasó a un tubo de 1,5 ml. Después de centrifugar a 13000 rpm durante 5 min. A continuación, la muestra se sometió a 4 pasos más de extracción (5 en total).

Las 3 primeras veces se usaron 450  $\mu$ l de tampón de extracción para resuspender los pellets, la 4ª extracción se utilizó 450  $\mu$ l tampón de extracción con etanol al 50 % (v/v) y en la última 450  $\mu$ l de  $H_2O$  destilada. Los sobrenadantes obtenidos de cada etapa contenían los azúcares solubles y fueron recogidos en un tubo de 2 ml hasta obtener un volumen final de aproximadamente 1,8 ml.

El precipitado contenía el almidón, y para proceder a su cuantificación los restos de hojas fueron resuspendidos en un 1 ml de una solución KOH 0,2 M, hervidos a 100 °C durante 45 min y centrifugados a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C. De este extracto se tomó un volumen de 500  $\mu$ l que fue ajustado a pH 5,0 añadiendo 150  $\mu$ l de ácido acético 1 N.

#### **E.5.- Determinación del contenido de azúcares solubles y almidón.**

La cuantificación de los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) contenidos en las muestras se basó en el mismo principio analítico, la determinación espectrofotométrica a 340 nm del NADPH formado en la conversión de glucosa a 6-fosfogluconolactona mediante la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Figura 22).

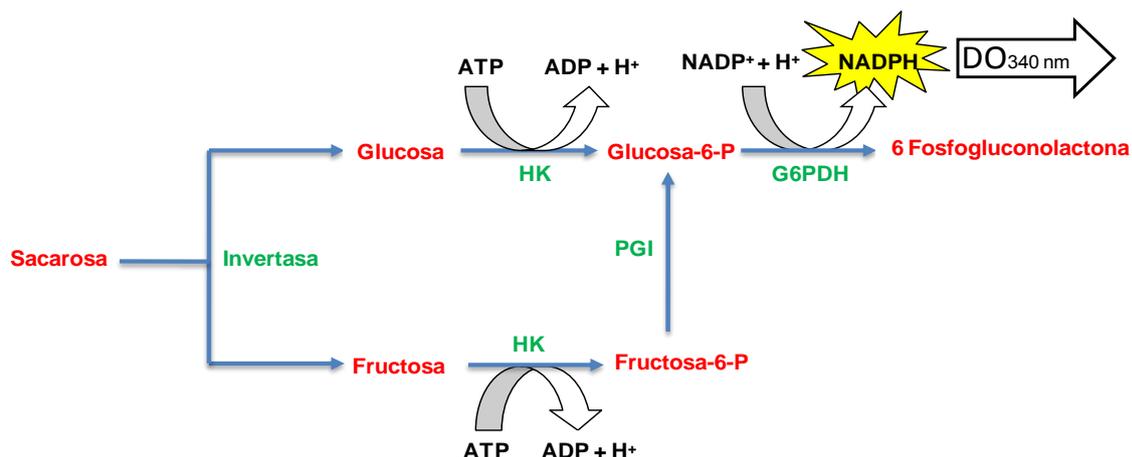


Figura 22.- Esquema del ensayo enzimático en la medida de azúcares solubles.

Para la determinación del contenido en almidón se utilizó el mismo método, tras la degradación previa de este polisacárido a glucosa por la acción de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa.

#### E.5.1.- Determinación de glucosa, fructosa y sacarosa.

En primer lugar se preparó la mezcla de reacción con 20 ml de tampón de reacción, compuesta por 100 mM HEPES-KOH a pH 7,0, 3 mM  $MgCl_2$ , 24 mg de NADP, 40 mg de ATP (Roche) y 40  $\mu$ l de G6PDH. Para llevar a cabo las determinaciones utilizamos una placa *microtiter* de 96 pocillos. En cada pocillo añadimos 5  $\mu$ l del extracto obtenido según el proceso descrito en el apartado E.4, y 200  $\mu$ l de tampón de reacción. A continuación el incremento de la absorbancia a 340 nm se determinó en un lector de placas, tomando como longitud de onda de referencia de 405 nm. A los 5 min del inicio de la reacción se añadieron 0,4  $\mu$ l (0,6 U) de hexoquinasa (HK, Roche) a cada pocillo. Como se muestra en la figura 22, añadiendo G6PDH y HK se analizó el contenido de glucosa. Una vez llegada a la fase *plateau* (aproximadamente a los 20-25 min) se añadió 0,8  $\mu$ l de fosfoglucoisomerasa (PGI, Roche) para medir la fructosa. A los 30 min de reacción, cuando establece alcanzó de nuevo otra fase *plateau*, se añadió 4  $\mu$ l de invertasa (Fluka) por pocillo y se continuó la medición otros 30 min. Las distintas reacciones enzimáticas dieron lugar a una gráfica que muestra la contribución equimolecular de cada uno de los azúcares a la producción de NADPH (Figura 23).

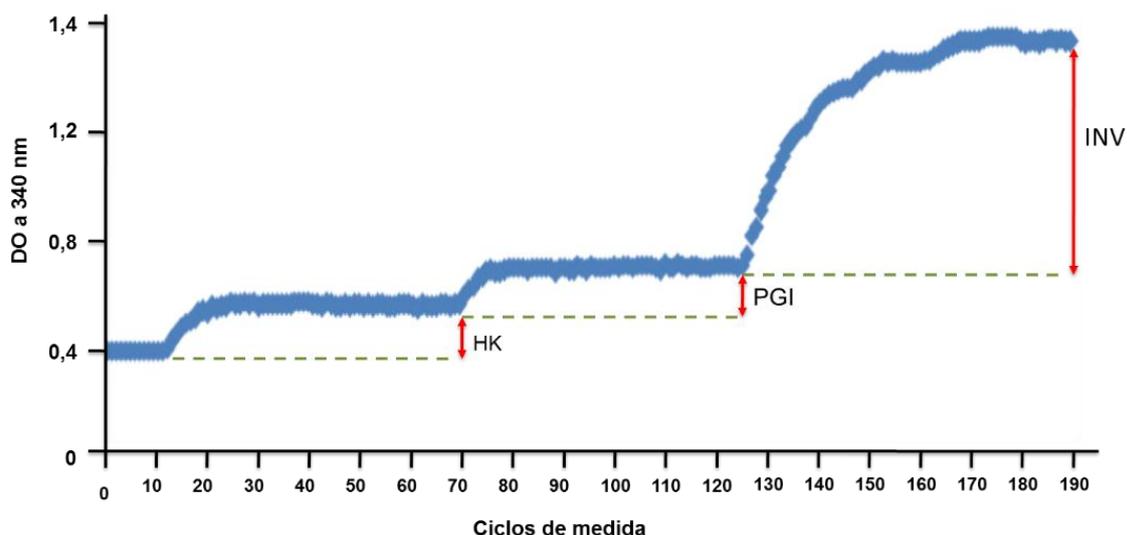


Figura 23.- Esquema de la determinación de azúcares. Cada una de las variaciones en las DO corresponde a la contribución de cada una de las enzimas HK (hexokinasa), PGI (fosfoglucoisomerasa) e INV (invertasa).

Para estimar la concentración de azúcares en las muestras por interpolación se elaboró una recta patrón con cantidades conocidas de glucosa, fructosa y sacarosa disueltas en tampón de reacción. Las cantidades de cada azúcar usadas en la recta fueron 0, 0, 5, 1, 3, 5, 10 y 20 mg/ml. El contenido de los azúcares contenidos en la muestra se presentó como gramos por gramo de peso fresco.

#### E.5.2.- Determinación de almidón.

La determinación del contenido en almidón se determinó en un volumen de 200  $\mu$ l del extracto obtenido según el protocolo descrito en el apartado E.4. Para la curva patrón se utilizaron cantidades conocidas de almidón de maíz (0, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 mg/ml). El proceso de degradación se llevó a cabo añadiendo 7,4 U de  $\alpha$ -amilasa (en 35  $\mu$ l de acetato sódico 0,1 M a pH 4,5) e incubando durante 30 min a 37  $^{\circ}$ C. A continuación se añadieron 5 U de amilogucosidasa (en 165  $\mu$ l de acetato sódico 0,1 M a pH 4,5), y se mantuvieron las muestras a 55  $^{\circ}$ C durante 1 h. Tras detener la reacción de degradación incubando durante 2 min a 100  $^{\circ}$ C, la solución se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. La determinación de la glucosa de las muestras se realizó de forma similar a la descrita en el apartado E5.1, para los azúcares solubles. En este caso solo se cuantificó la concentración de glucosa ya que es proporcional a la concentración de almidón. El contenido de almidón expresado en gramos por gramo de peso fresco se obtuvo interpolando las absorbancias medidas a 340nm en la recta patrón.

## E.6.- Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos.

### E.6.1.- Clorofilas y carotenoides.

Para la cuantificación del contenido en clorofilas y carotenoides se siguió un protocolo adaptado de Wellburn y col. (1994) (Wellburn, 1994). El protocolo consistió en tomar 50 mg de hojas de roseta, que se pulverizaron en mortero con ayuda de N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente se adicionó 1 ml de acetona fría al 80% (v/v) y se transvasó el extracto a un tubo de 1,5 mL. Los tubos se sometieron a agitación toda la noche, a 4 °C y en oscuridad. Los extractos se centrifugaron durante 10 min a 13000 rpm, recuperando únicamente el sobrenadante. Los pigmentos se cuantificaron en un espectrofotómetro modelo “*Lambda 35*” (Perkin Elmer) midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 663,2 (clorofila *a*), 646,8 (clorofila *b*) y 470 nm (carotenos). La concentración de clorofilas y carotenoides, representada en gramos por gramos peso fresco, se determinó en base a las fórmulas representadas en la tabla 8.

Pigmento	Fórmula
Clorofila a	$C_a = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$
Clorofila b	$C_b = 21.5 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}$
Clorofilas totales	$C_{a+b} = 7.15 A_{646.8} + 18.71 A_{663.2}$
Carotenos	$C_{x+c} = (1000 A_{470} - 1.82 C_a - 85.02 C_b) / 198$

Tabla 8.- Fórmulas utilizadas para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos: clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totales y carotenos.

### E.6.2.- Antocianinas.

El procedimiento de extracción y cuantificación de antocianinas consistió en un protocolo adaptado de Rabino y Mancinelli (1986) (Rabino and Mancinelli (1986) que consistía en tomar 50 mg de hojas de roseta, congelarlas con N<sub>2</sub> líquido y trituradas en mortero hasta pulverizarlas. Se añadía rápidamente 1 ml de una dilución de HCl al 1% (v/v) en metanol, se transvasó el extracto a un tubo de 1,5 ml y se incubó en agitación toda la noche a 4 °C y en oscuridad. Los extractos se centrifugaron 10 min a 13000 rpm. A continuación se determinaron las antocianinas midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 530 y 657 nm. La concentración de antocianinas, dada en gramos por gramo de peso fresco se determinó en base a fórmula:  $C_{\text{antocianinas}} = (A_{530} - 0,2 A_{657})$ .

## **E.7.- Técnicas de microscopía.**

### E.7.1.- Detección de fluorescencia mediante microscopía confocal.

El estudio de las líneas mutantes de *A. thaliana* con proteínas de fusión a GFP y de muestras teñidas con yoduro de propidio se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

Para la detección de la señal de fluorescencia y captura de imágenes de alta resolución en distintos órganos se usó el Sistema Modular de Microscopía de Barrido Laser Confocal C-1 (Nikon) que contaba con los objetivos y las ópticas para posicionamiento de las muestras y fluorescencia para la detección de señal GFP.

### E.7.2.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La visualización de las estructuras subcelulares de las hojas de roseta se realizó mediante el uso de un microscopio electrónico de transmisión. Para ello las muestras trozos pequeños de hojas de roseta de plantas de 25 dpq (días post-germinación), pertenecientes a cada una de las líneas mutantes, fueron previamente sometidas en a un protocolo de inclusión en resina epón por el Servicio de Microscopía de la Estación Experimental del Zaidín. Tras este paso se realizaron cortes ultra-finos en el Servicio de Microscopía del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada con un micrótopo modelo “*Ultracut R*” (Leica). Los cortes ultra-finos fueron teñidos y depositados en rejillas para su posterior observación en un Microscopio de transmisión electrónica TEM modelo “*Libra 120 Plus*” (Carl Zeiss) del CIC.

### E.7.3.- Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La observación de la epidermis de las hojas de roseta de plantas de 25 dpq, pertenecientes a cada una de las líneas mutantes, se realizó en un Microscopio Electrónico de Barrido de Presión Variable modelo LEO 1430-VP del Servicio de Microscopía del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Para ello, trozos de hojas se colocaron en su lado abaxial o adaxial sobre un soporte, y se metalizaron con Au, previa deshidratación, fijación y secado. Este tratamiento fue llevado a cabo por el Servicio de Microscopía del CIC-UGR.

#### E.7.4.- Microscopía óptica.

Para la observación de las estructuras celulares de hojas y raíces de *Arabidopsis*, las muestras incluidas en la resina epón fueron cortadas en láminas con micrótomos en los laboratorios del Servicio de Microscopia del CIC-UGR y depositadas en portaobjetos (de Dios Barajas-Lopez et al., 2007). Los cortes semi-finos (1 mm) fueron teñidos con azul de toluidina y dejados secar. Para la observación y captura de imágenes se utilizó un microscopio óptico OLYMPUS BX51 del CIC-UGR.

#### **E.8.- Determinación de parámetros fotosintéticos.**

##### E.8.1.- Determinación de la tasa fotosintética.

Para determinar la tasa fotosintética de cada una de las líneas mutantes de *A. thaliana* se utilizó un IRGA (analizador de gas por infrarrojo), modelo “LI-6400” (LI-COR Biosciences, figura 24).

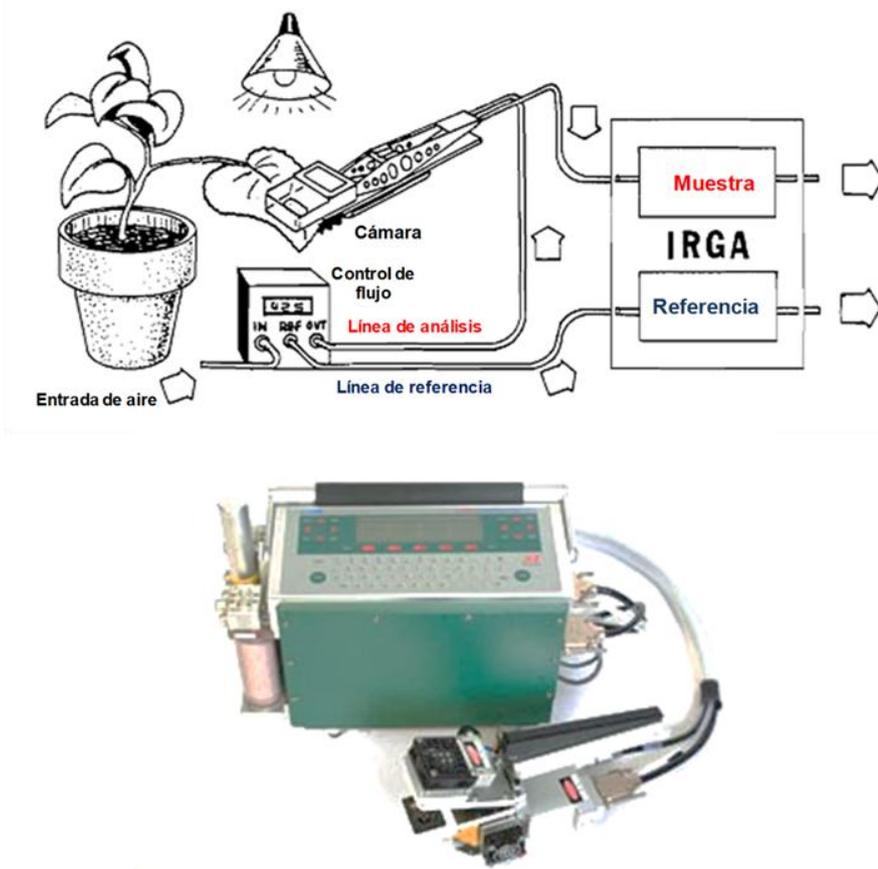


Figura 24. Arriba, esquema sobre el funcionamiento del IRGA (adaptado de Alan Rhodes, Mulkey & Smith 1998). Abajo, fotografía del equipo completo (tomada de la página web [www.licor.com](http://www.licor.com)).

Este equipo posee dos analizadores de gases por infrarrojo para CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (*Infrared Gas Analyzer*, IRGA) integrados en una pinza portátil que son capaces de medir cambios en un sistema abierto de medición. Uno de los IRGA mide el contenido de una cámara donde se colocan las muestras, mientras que el otro realiza mediciones de referencia. El aparato puede modificar las concentraciones de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en el aire que le llega a la cámara mediante depuradores que filtran el aire ambiental, aunque también puede usar una unidad de abastecimiento de CO<sub>2</sub> comprimido. El flujo con el que circulan estos gases es constante y renueva el aire dentro de la cámara para que no se vea modificado por la transpiración o la fotosíntesis de la hoja.

La tasa de fotosíntesis neta (A) y la tasa de transpiración (E) son calculados de forma directa a partir de la diferencia entre el contenido de CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O que detecta el IRGA de referencia y del gas que sale de la cámara donde se encuentra la hoja, teniendo en cuenta para el cálculo el flujo de gas y el área analizada (de forma que  $A = \text{Flujo} \cdot \Delta\text{CO}_2 \cdot \text{Área}^{-1}$  y  $E = \text{Flujo} \cdot \Delta\text{H}_2\text{O} \cdot \text{Área}^{-1}$ ). Como unidad de medida para estos parámetros se utilizan  $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y  $\mu\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . El equipo puede también determinar a partir de las variaciones de CO<sub>2</sub> medidas para la fotosíntesis neta y de forma indirecta la concentración de CO<sub>2</sub> intercelular de la hoja ( $C_i$ ), y a partir de la transpiración y la diferencia entre el déficit de presión de vapor de la hoja y del aire de la cámara la conductancia estomática ( $g_s$ ).

Justo antes de proceder a las determinaciones el aparato fue calibrado, y fijados el área de la hoja, el flujo de la corriente y la temperatura, que se ajustó a 22 °C, la temperatura a la que crecieron las plantas. El procedimiento experimental consistió en la captura con la pinza del equipo de una hoja unida a la roseta de una planta de *A. thaliana* de 25 días de crecimiento. Se midieron al menos 5-7 plantas por cada línea de *A. thaliana*. Las áreas foliares fueron determinadas mediante escaneo de las mismas y empleo del programa Adobe Photoshop CS5. Los resultados de cada uno de los parámetros fotosintéticos obtenidos fueron normalizados al área real de la hoja, gracias al software de cálculo de LICOR.

Para realizar las medidas de los distintos parámetros fotosintéticos se fijó una concentración de CO<sub>2</sub> de 400 ppm. Tras la adaptación de las hojas a la oscuridad, se determinó la tasa fotosintética a distintas intensidades de luz (Q): 0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 μmol de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (*Photosynthetic Active Radiation*, PAR), obteniendo una curva (A/Q) de luz en cada caso.

#### E.8.2.- Medidas de fluorescencia.

La energía de la luz que es absorbida por los complejos colectores del fotosistema II es rápidamente transferida a la clorofila *a*, la cual puede relajarse de tres maneras diferentes: mediante los procesos fotoquímicos (reducción de quinonas mediante transferencia electrónica procedente de la clorofila P<sub>680</sub>), los procesos no fotoquímicos (principalmente la emisión de calor) y/o la emisión de fluorescencia (Figura 25). Este último tipo de emisión se empleó para el estudio de las reacciones lumínicas y del estado del fotosistema II de las plantas en estudio mediante el uso de un fluorímetro *PEA* (Hansatech).

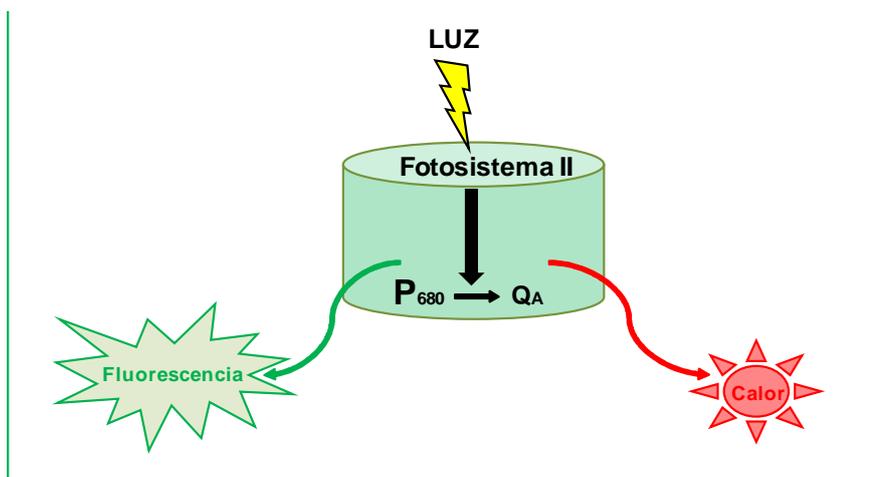


Figura 25.- Esquema de los posibles destinos de la energía lumínica absorbida por el fotosistema II.

Las plantas fueron adaptadas a oscuridad durante 20 min. La medida de la fluorescencia de la clorofila se realizó en hojas de varias plantas de *A. thaliana* con el objeto de obtener los niveles basales de fluorescencia (F<sub>0</sub>) mediante excitación con luz roja azul modulada a 800 Hz durante 2 s de iluminación y los niveles máximos de fluorescencia (F<sub>m</sub>) inducidos por un pulso intenso de luz blanca de 800 ms. La eficiencia de la energía de excitación capturada por el fotosistema II fue calculada mediante la siguiente fórmula:  $(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$ .

### E.9.- Tinción histoquímica para $\beta$ -glucuronidasa (GUS).

El análisis histológico de las líneas transgénicas de *Arabidopsis* con construcciones del gen reportero *uidA* que expresa la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) bajo el control de los promotores de las TRXs *f* y *m1*, obtenidas previamente en nuestro grupo de investigación (De Dios Barajas-López et. al., 2007) y descritas en la figura 26, se llevó a cabo mediante tinción histoquímica que reveló la presencia de la proteína GUS en los diferentes tejidos de la planta (Weigel and Glazebrook, 2002).

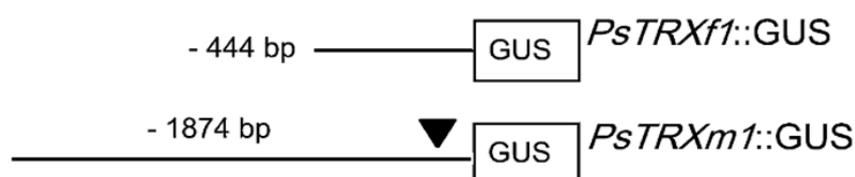


Figura 26.- Construcciones que portan la fusión traduccional de las secuencias promotoras de las TRXs *f* y *m1* de guisante (Barajas-López et. al., 2007).

La composición del tampón necesario para la tinción GUS se describe en la tabla 9. Las plantas se sumergieron en el tampón y sometieron a infiltración por vacío 3 veces durante 10 min, para después dejar las muestras incubando en la solución durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se decoloraron las plántulas mediante sucesivos lavados en etanol al 70%, con el fin de eliminar la clorofila dejando única y exclusivamente la coloración debida a la reacción enzimática GUS sobre el sustrato X-GlcA. Las plantas transgénicas de *A. thaliana* tratadas con esta tinción se visualizaron en una lupa “AX-70” (Olympus).

Compuesto	Concentración final
Fosfato sódico pH 7.0	100 mM
X-GlcA	1 mg/mL
EDTA pH 8.0	1 mM
Ferricianida potásica (II)	50 mM
Ferricianida potásica (III)	50 mM
Tritón X-100	1% (v/v)

Tabla 9.- Componentes de la tinción histoquímica GUS.

## E.10.- Medida del contenido en ROS.

### E.10.1.- Determinación *in situ* de peróxido de hidrógeno.

Para esta determinación, 3-4 rosetas de plantas de *A. thaliana* de 25 dpq se sumergieron en un tampón Tris-acetato 50 mM a pH 5,0 y 3,3-diaminobenzidina (DAB) a 1 mg/mL. Las muestras fueron infiltradas mediante la aplicación de vacío durante 5 min (3 veces), y preservadas de la luz en todo momento. A continuación se incubaron a 25 °C y en oscuridad durante 24 h. El DAB reaccionó con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dando lugar a un producto de coloración marrón rojizo (Hernandez et al., 2001). Los restos de tampón fueron eliminados mediante varios lavados con H<sub>2</sub>O destilada. Para eliminar las clorofilas las rosetas se incubaron a 37 °C en etanol al 70% hasta que todos los pigmentos fueron eliminados.

### E.10.2.- Determinación *in situ* del anión superóxido.

Para esta determinación 3-4 rosetas de plantas de 25 días se sumergieron en tampón fosfato 50 mM a pH 7,5 y nitroazul de tetrazolio (*Nitroblue tetrazolium*, NBT) al 0,2 % (p/v). Las muestras fueron infiltradas mediante 3 aplicaciones de vacío durante 5 min, y preservadas de la luz en todo momento. A continuación se incubaron a 25 °C y en oscuridad durante 24 h. El NBT reaccionó con el O<sub>2</sub><sup>-</sup> dando lugar a un precipitado azul oscuro (Maly et al., 1989). Los restos de tampón fueron eliminados mediante varios lavados con H<sub>2</sub>O destilada. Las clorofilas se eliminaron incubando a 37 °C en etanol al 70% hasta que todos los pigmentos fueron eliminados.

## F.- Sección VI: Software informático y recursos *on-line*.

### F.1.- Software para análisis de ácidos nucleicos y proteínas.

- Se utilizó el programa de software libre “*PlasmaDNA*” (Angers-Loustau et al., 2007) para la comparación y análisis de secuencias de ADN y proteínas y diseño de oligonucleótidos.
- Para el tratamiento de los datos obtenidos de la PCR-cuantitativa se usó el programa “*iQ5 Optical System Software*®” (Bio-Rad).

- El software “*Quantity One*®” (Bio-Rad) se empleó para la observación y cuantificación de las bandas correspondientes a los geles de agarosa, y las bandas de las membranas obtenidas por *western-blotting*.
- Para el análisis de geles bidimensionales se usó el programa “PDQuest 2-D Analysis Software®” (Bio-Rad)

#### F.2.- Software para tratamiento de imágenes.

- Para el tratamiento de imágenes y el cálculo de áreas fueron usados los programas “*Photoshop CS5*®” (Adobe) e ImageJ ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)).
- Para el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se usó el programa de edición de imágenes “Nikon EZ-C1 FreeViewer®” (Nikon).

#### F.3.- Software para análisis de parámetros fotosintéticos.

Los datos de fotosíntesis neta ( $A$ ) frente a PAR fueron analizados mediante el programa *Photosyn Assistant* de la Universidad de Dundee (UK) ([www.ddsci.com](http://www.ddsci.com)). Este software permite estimar la eficiencia cuántica aparente ( $\phi$ ), el valor de fotosíntesis neta máxima ( $A_{max}$ ), el punto de compensación de luz ( $\Gamma_i$ ) y el punto estimado de saturación por luz ( $A_{sat}$ ) y la tasa de respiración mitocondrial aparente ( $R_{day}$ ).

#### F.4.- Recursos *on-line* utilizados.

- Para las búsquedas de bibliografía y de secuencias de genes y plásmidos se utilizaron los motores de búsqueda “Pubmed”, del “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)), y los del “*European Molecular Biology Laboratory*” (EMBL-EBI) [www.ebi.ac.uk/embl/](http://www.ebi.ac.uk/embl/).
- Las secuencias de los péptidos señal conocidas de algunas TRXs se obtuvieron de la base de datos de UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>). Esta misma página se usó para conocer el número de identificación de las proteínas identificadas por espectrometría de masas.

- Para el mapeo completo de los locus en los que se encuentran integradas las secuencias génicas de las TRXs así como para localizar las distintas inserciones (T-DNA) que se encuentran en los distintos mutantes de inserción usados, se recurrió a las herramientas del portal *The Arabidopsis Information Resource*, TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)).
- Se utilizó la aplicación PLACE (*A Database of Plant Cis-Acting Regulatory DNA Elements*) [www.dna.affrc.go.jp/PLACE/](http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/) para la predicción de elementos reguladores de la transcripción en las secuencias promotoras de las TRXs.
- Los datos de expresión génica de distintos genes fueron tomados del portal de la Universidad de Toronto (<http://bar.utoronto.ca>). En concreto gracias a la aplicación de bioinformática *Classification Super Viewer* [http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools\\_classification\\_superviewer.cgi](http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi).





### **III.- OBJETIVOS**



Los estudios previos indican que las TRXs plastídicas se localizan en órganos y tejidos no verdes, cumpliendo funciones no relacionadas con la fotosíntesis pero de gran importancia fisiológica para las plantas. Las familias *f* y *m* suponen un paradigma dentro de esta línea de investigación suponiendo un desafío de interés el determinar si existen roles específicos para cada una de sus isoformas dentro de la planta o desempeñan funciones redundantes. En base a ello se plantean los siguientes objetivos:

1. Analizar el patrón de expresión génica y proteica de las TRXs tipo *f* y *m* de *A. thaliana* en distintas regiones de su anatomía.
2. Estudio de las regiones reguladoras aguas arriba de los genes codificantes de las TRXs *f* y *m* de Arabidopsis. Localización *in vivo* de cada isoforma en distintos órganos de la planta.
3. Expresión de las formas recombinantes purificadas de las TRXs *f* y *m* de *A. thaliana*. Estudio *in vitro* de sus características funcionales. Búsqueda de proteínas diana en órganos no fotosintéticos.
4. Aislamiento de líneas mutantes con pérdida de función para cada una de las TRXs *f* y *m* de *A. thaliana*. Búsqueda de nuevas funciones específicas para las distintas isoformas de las TRXs *f* y *m* de *A. thaliana*, mediante la caracterización fisiológica, bioquímica y proteómica.
5. Estudio de la respuesta de las TRXs *f* y *m* frente la salinidad durante el estadio post-germinativo de las plántulas.







## **IV.- RESULTADOS**



## A.- Expresión y localización de TRXs *f* y *m* de Arabidopsis.

### A.1.- Expresión génica en diferentes órganos.

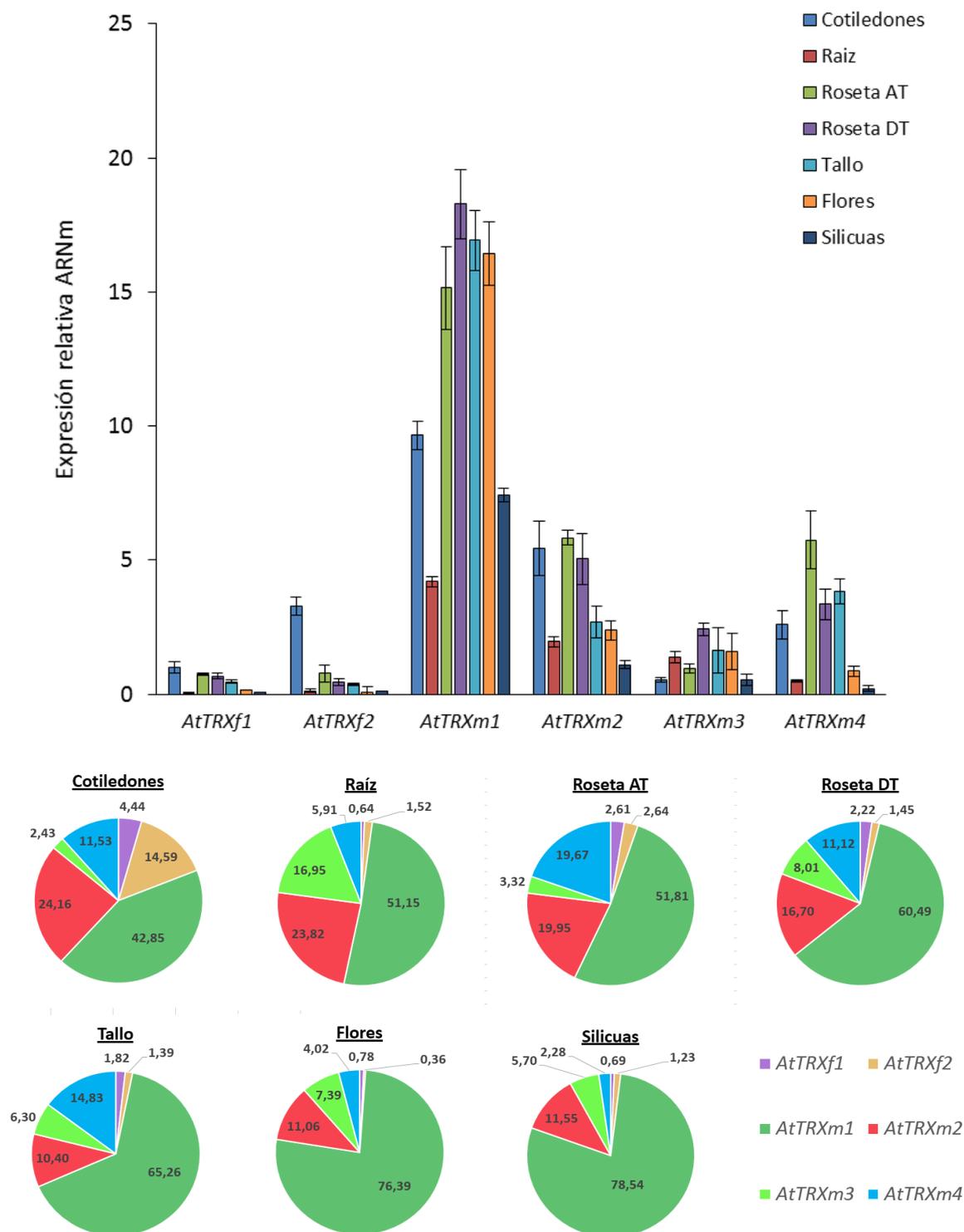
El análisis de la expresión de los genes *AtTRXf1*, *f2*, *m1*, *m2*, *m3* y *m4* en cotiledones, plántulas, raíces, rosetas, flores, tallos y silículas de *A. thaliana* se llevó a cabo usando la técnica de RT-qPCR. Las muestras de cotiledón procedían de plántulas de 3 dpv, mientras que las raíces se tomaron de plantas de 10 dpv, en ambos casos de cultivos in vitro en medio MS y en condiciones de día largo. El resto de órganos fueron recolectados de plantas de 25 dpv cultivadas en tierra en condiciones de día largo. Los valores de expresión relativa obtenidos se representan en la figura 27.

Los niveles de expresión de *AtTRXf1* y *AtTRXf2* fueron significativamente inferiores a los obtenidos para las TRXs de tipo *m* (con excepción de los encontrados en cotiledón), destacando los mayores niveles de transcritos observados en órganos fotosintéticos y la baja acumulación de ARNm en raíces, flores y silículas.

En cuanto a los patrones de expresión de las TRXs *m*, se apreció una mayor acumulación de mensajero de *AtTRXm1* en cotiledones, hojas de roseta y tallo, seguida por *AtTRXm2* y *AtTRXm4*. Los niveles de transcrito de *AtTRXm3* fueron los más bajos entre todas las isoformas estudiadas. En los órganos no fotosintéticos *AtTRXm1* mostró mayores niveles de ARNm que *AtTRXm2*, *AtTRXm3* y *AtTRXm4*, esta última con los valores más bajos entre todas las TRXs *m*.

### A.2.- Estudio “*in silico*” del contenido de proteínas en distintos órganos.

El análisis bioinformático del contenido de TRXs *f* y *m* en distintos órganos de *A. thaliana* se realizó utilizando la base de datos PaxDB (Wang et al., 2012), que proporcionó datos cuantitativos correspondientes a las distintas isoformas en cotiledon, raíz, roseta, tallo, flores y silicua (Figura 28).



Las isoformas de TRXs *f* y *m* se encuentran presentes en la mayoría de los órganos analizados, con la excepción de TRX *m3*, dónde no fue posible localizarla ni en tallo ni en silicua, quizás, en parte, debido a la baja expresión de esta isoforma. Comparando los perfiles de acumulación de ARNm y de proteína para las TRXs *f*, se pueden observar diferencias en ambas gráficas que sugieren un control a nivel post-transcripcional en la expresión de las mismas, siendo *TRXf1* más expresada a nivel proteico que *TRXf2* (aprox. el doble). Mediante un análisis comparativo similar con las TRXs *m* se llegó a la misma conclusión que para las TRXs *f*: el contenido final de TRXs plastidiales podría depender tanto de los niveles de transcrito para las mismas como de posibles eventos de regulación post-transcripcional (o traduccional).

Se puede apreciar como el contenido proteico de las distintas TRXs *f* y *m* seguiría el siguiente orden cuantitativo: TRX *m1* > TRX *m4* > TRX *m2* > TRX *f1* > TRX *f2* > TRX *m3*. El contenido en raíz parece similar para TRXs *m1*, *m2* y *m3*, que a su vez es 4-6 o 10-15 veces superior a los de las TRXs *f* o TRX *m4*, respectivamente.

Como podría esperarse, el mayor contenido se da en hojas de roseta y en tallo, con la excepción de las isoforma TRX *m3*, más expresada en raíz que en órganos fotosintéticos. El perfil proteico en cotiledones, roseta y tallo parece seguir un patrón constante con un contenido similar de TRX *m1*, *m2* y *m4*. Sin embargo, este patrón cambia en flores, con un mayor contenido de TRX *m1* y en silicuas, donde el contenido de TRX *m4* destaca sobre las demás isoformas mayoritarias (TRX *m1* y *m2*).

### **A.3.- Búsqueda de motivos reguladores en las secuencias promotoras.**

El análisis de las secuencias promotoras de las TRXs *f* y *m* de *A. thaliana* fue realizado mediante el uso de la base de datos *PLACE* (Higo et al., 1999). Mediante esta búsqueda se identificaron 35 motivos reguladores distintos, los cuales se agruparon en base a las funciones o localizaciones descritas para ellos en órganos heterotróficos (raíces y flores), en procesos fisiológicos relacionados con el metabolismo del carbono, la regulación dependiente de la luz, el desarrollo de las semillas/germinación y la respuesta a estrés abiótico.

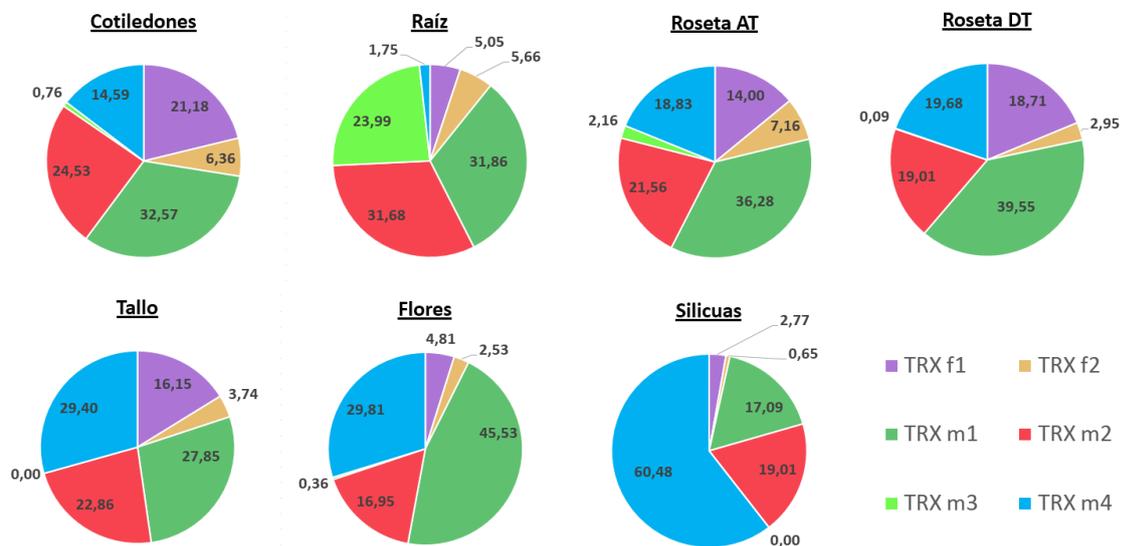
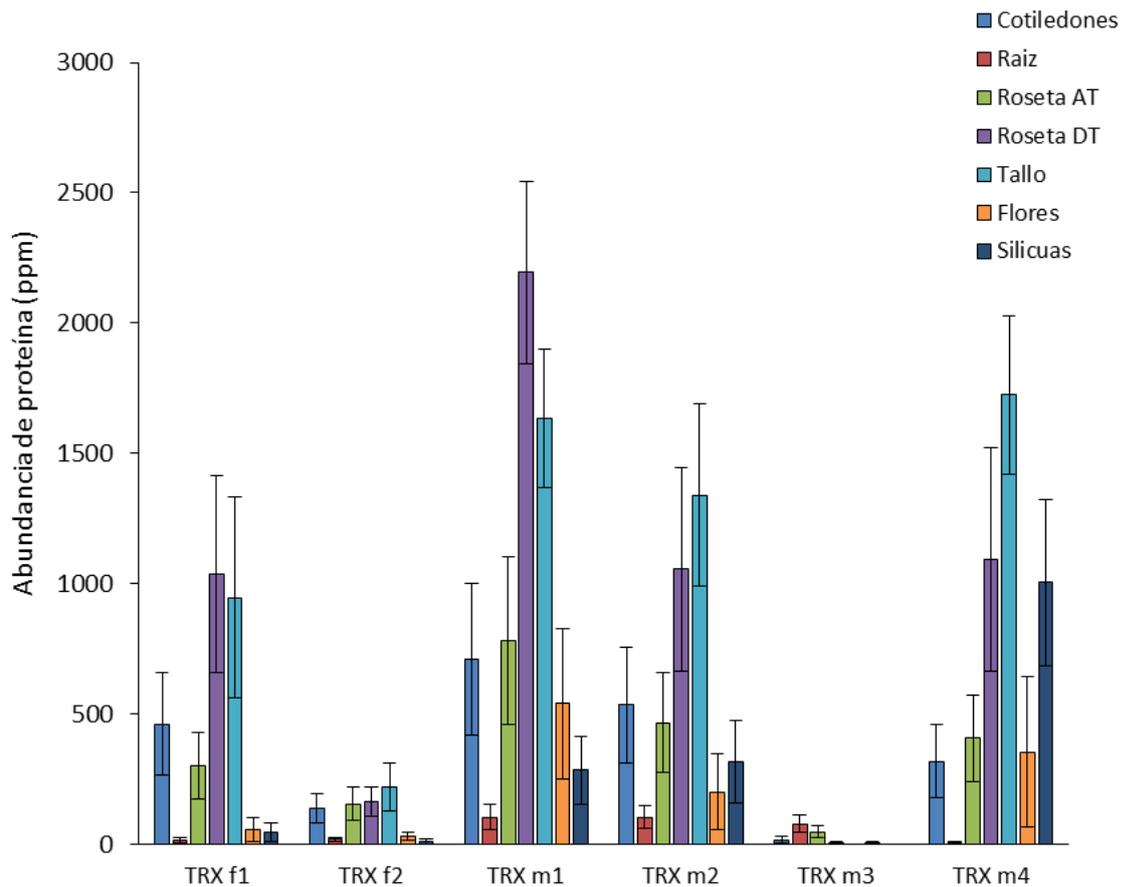


Figura 28.- Arriba, cuantificación de TRXs *f* y *m* en distintos órganos de *A. thaliana* (cotiledones, raíz, roseta, tallo, flores y silicuas) expresado como abundancia de proteína en partes por millón (ppm), usando los datos suministrados por PaxDB (Wang et al., 2012)(Wang et al., 2012)(Wang et al., 2012). Abajo, gráficos sectoriales donde se representa, para cada tejido analizado, los porcentajes correspondientes proporcionalmente a cada proteína respecto del total de proteína cuantificada.

La localización de dichos elementos dentro de las correspondientes secuencias promotoras se muestra como contenido suplementario en el Capítulo de Apéndices (Figura S1).

El resultado de esta búsqueda mostró la existencia de elementos reguladores relacionados con la respuesta a estrés (1), la regulación por luz (2), la expresión en raíz (3), el metabolismo del C (4), la embriogénesis (5) y la expresión en flores (6). En la tabla 10 se resumen los elementos encontrados en cada promotor y se indican sus secuencias consenso.

### (1) Respuesta a estrés

- La secuencia TAAAGSTKST1 se relaciona con la activación de un canal iónico para K<sup>+</sup> denominado KST1, localizado en células guarda en *S. tuberosum*. A este elemento se unen factores de transcripción de la familia Dof (Plesch et al., 2001). El elemento PREARPRODH es una secuencia de 6 pb descrita en el promotor del gen de la prolina deshidrogenasa (ProDH) de *A. thaliana*, implicada en la inducción de la expresión génica en respuesta a procesos de hipo-osmolaridad por deficiencia de prolina en el medio (Sato et al., 2004). MYB1AT y MYBST1 son elementos reguladores de respuesta a estrés hídrico a los que se unen factores de transcripción de la familia MYB (Baranowskij et al., 1994). Aparecieron otros elementos relacionado con la expresión de genes de soja inducibles por calor que codifican para chaperonas CCAATBOX1, RAV1AAT, OBP1ATGST6 y ACGTATERD1. CCAATBOX1 (CCAAT) (Rieping and Schoffl, 1992); RAV1AAT (CAACA) es un motivo relacionado con los factores de transcripción RAV de *A. thaliana* e implicado en mecanismos de regulación de respuesta a sequía y sales (Fu et al., 2014); OBP1ATGST6 (TACACTTTTGG) se está en la región reguladora de diferentes isoformas de la glutatión S-transferasa (GST) que participan la detoxificación de xenobióticos y la protección de contra el daño oxidativo (Chen et al., 1996); y ACGTATERD1 (ACGT) se describió en el promotor del gen *erd1* de *A.thaliana* y se encuentra implicado en procesos de respuesta a deshidratación y a etiolación (Simpson et al., 2003).

Motivo	Secuencia	ID	Nº de repeticiones					
			<i>f1</i>	<i>f2</i>	<i>m1</i>	<i>m2</i>	<i>m3</i>	<i>m4</i>
(-)10PEHVPSBD	TATTCT	S000392	0	0	0	0	1	0
ACGTABOX	TACGTA	S000130	0	2	1	0	0	0
ACGTATERD1	ACGT	S000415	0	3	2	1	2	3
AMYBOX1	TAACAAA	S000020	1	0	0	1	1	0
AMYBOX2	TATCCAT	S000021	0	1	0	0	0	0
BOXCPSAS1	CTCCCAC	S000226	0	1	0	0	0	0
CAATBOX1	CAAT	S000028	4	6	8	9	7	6
CCA1ATLHCB1	AAAAATCT	S000149	0	0	0	2	0	0
CCAATBOX1	CCAAT	S000030	1	0	3	3	3	2
CGACGOSAMY3	CGACG	S000205	0	1	0	0	0	0
DOFCOREZM	AAAG	S000265	8	8	4	4	4	8
EVENINGAT	AAAATATCT	S000385	0	0	0	1	0	1
GATABOX	GATA	S000039	5	3	7	3	2	4
GT1CONSENSUS	GAAAAA	S000198	3	0	1	2	1	2
GTGANTG10	GTGA	S000378	0	1	4	2	3	4
IBOXCORE	GATAA	S000199	3	2	2	0	0	1
MYB1AT	AAACCA / TAACCA	S000408	0	1	3	0	6	1
MYBATRD22	CTAACCA	S000175	0	0	0	0	0	1
MYBST1	GGATA	S000180	1	1	2	1	0	1
OBP1ATGST6	TACACTTTTGG	S000305	1	0	0	0	0	0
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	S000467	0	1	0	0	1	1
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	S000468	1	0	2	1	2	1
POLASIG1	AATAAA	S000080	3	1	0	1	4	0
POLASIG2	AATTAAT	S000081	1	1	1	1	0	0
POLASIG3	AATAAT	S000088	2	0	2	1	2	0
POLLEN1LELAT52	AGAAA	S000245	7	3	6	6	4	2
RAV1AAT	CAACA	S000314	1	3	2	1	0	1
RBCSCONSENSUS	AATCCAA	S000127	2	0	2	0	0	0
RYREPEATVFLEB4	CATGCATG	S000102	1	0	0	0	0	0
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	S000098	1	3	2	4	3	1
SEF4MOTIFGM7S	ATTTTAA / GTTTTTG	S000103	2	1	1	3	1	0
TAAAGSTKST1	TAAAG	S000387	0	2	1	1	1	1
TBOXATGAPB	ACTTTG	S000383	0	2	0	2	0	1
WBOXHVISO1	TGACT	S000442	1	1	0	3	2	1
WUSATAg	TTAATGG	S000433	0	0	1	0	0	1

Tabla 10.- Nombre, secuencia de nucleótidos y números de identificación y de repeticiones de los motivos reguladores hallados en las secuencias reguladoras de los genes codificantes de TRXs *f* y *m* de *A. thaliana* mediante la herramienta de bioinformática PLACE.

## (2) Regulación por luz

- Destaca un significativo número de elementos descritos en regiones reguladoras de genes modulados por luz. Es el caso de BOXCPSAS1 (CTCCCAC), presente en promotores de los genes de la asparagina sintetasa AS1 y AS2 (Ngai et al., 1997); TBOXATGAPB (ACTTTTG) descrito en el promotor del gen que codifica para la subunidad B de la *GADPH* (Chan et al., 2001); y RBCSCONSENSUS (AATCCAA), asociado al promotor del gen regulado por luz *rbcS-1a* (Donald and Cashmore, 1990).
- Se identificaron elementos reguladores de genes relacionadas con los fotosistemas. Es el caso de CCA1ATLHCB1 (AAAAATCT), descrito en la región promotora del gen *Lhcb1* (*Light-harvesting chlorophyll a/b*) y asociado al factor de transcripción CCA1 y fotocromos (Wang et al., 1997); -10PEHVPSBD (TATTCT), localizado en el gen plastidial *psbD* que codifica para la proteína D2 (Thum et al., 2001); GATABOX (GATA), un motivo altamente conservado en promotores de proteínas de unión a clorofila (Lam and Chua, 1989); IBOXCORE (GATAA), secuencias consenso descritas en los promotores de genes regulados por luz en dicotiledóneas y monocotiledóneas (Terzaghi and Cashmore, 1995); GT1CONSENSUS (GAAAAA), sitio de unión a factores de transcripción del tipo GT-1 implicados en la expresión génica en órganos fotosintéticos (Villain et al., 1996); y EVENINGAT (AAAATATCT), también llamado "*Evening Element motif*" y relacionado con el control circadiano de la expresión génica (Harmer et al., 2000; Rawat et al., 2005).

## (3) Expresión en raíces

- Se identificaron varios elementos implicados en la expresión en raíces tales como WUSATAg (TTAATGG), presente en el promotor del gen que codifica para la proteína WUS de *A. thaliana* y que desempeña un papel importante en la diferenciación de las células de los meristemas apicales de la raíz o del tallo (Kamiya et al., 2003); OSE2ROOTNODULE (CTCTT) y OSE1ROOTNODULE (AAAGAT), elementos especialmente activos en células de la raíz de plantas infectadas por bacterias fijadoras de nitrógeno

(Vieweg et al., 2004); y ROOTMOTIFTAPOX1 (ATATT), un motivo presente en el promotor del gen *roID* de *A. rhizogenes*, un transgen que, al insertarse en el genoma de la planta, induce el desarrollo de la raíz en beneficio de la bacteria (Elmayan and Tepfer, 1995; Altamura, 2004).

#### (4) *Metabolismo del C*

- También el análisis reveló secuencias presentes en promotores de genes relacionados con el metabolismo del C. Así, se encontraron motivos comunes en  $\alpha$ -amilasa como AMYBOX1 (TAACAAA), AMYBOX2 (TATCCAT) y CGACGOSAMY3 (CGACG) que aparecen en los genes de  $\alpha$ -amilasas de arroz, y análogos en cebada y trigo, donde juegan un papel clave en la producción de azúcar a partir del almidón almacenado en el grano (Huang et al., 1990; Hwang et al., 1998).

- Otro elemento regulador presente en las vías de asimilación de azúcares es WBOXHVISO1(TGACT), denominado también SURE, y descrito por primera vez en el promotor de la patatina (Sun et al., 2003). Por último, se encontraron múltiples repeticiones de DOFCOREZM (AAAG), secuencia consenso de reconocimiento de la familia de factores de transcripción DOF relacionadas, entre otros procesos, con el metabolismo del C (Yanagisawa and Schmidt, 1999; Yanagisawa, 2000).

#### (5) *Embriogénesis*

- Asimismo, se evidenció la presencia de numerosos elementos presentes en genes involucrados en la formación y desarrollo de la semilla: ACGTABOX (TACGTA), que actúa en *cis* como activador transcripcional del gen *RITA-1*, altamente expresado durante el desarrollo de la semilla (Izawa et al., 1994); POLASIG1 (AATAAA), POLASIG2 (AATTAAA) y POLASIG3(AATAAT), motivos encontrados en promotores de genes que codifican para las distintas isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa implicadas en la germinación de semillas de arroz (Joshi, 1987; O'Neill et al., 1990); SEF4MOTIFGM7S (ATTTTAA-GTTTTTG), secuencia reconocida por el factor de transcripción SEF3, cuya actividad se relaciona con la expresión de  $\beta$ -conglucina en los embriones de soja (Allen et al., 1989); y

CAATBOX1 (CAAT) encontrado en el promotor del gen *LegA* que codifica para una proteína importante de almacenamiento de semillas durante la maduración de los cotiledones (Shirsat et al., 1989).

#### (6) Expresión en flores

- Por último, se hallaron motivos reguladores relacionados con la expresión génica específica de inflorescencias: RYREPEATVFLEB4 (CATGCATG), que regula negativamente al gen *AtHsp90-1* en granos de polen maduros (Haralampidis et al., 2002); GTGANTG10 (GTGA) presente en la secuencia promotora del gen *g10* en tabaco, que se expresa preferentemente en polen maduro y en las anteras maduras (Rogers et al., 2001); y POLLEN1LELAT52 (AGAAA), elemento regulador de la expresión de la endo- $\beta$ -mananasa *LeMAN5*, gen cuya localización se ha observado en las anteras y el polen de tomate (Filichkin et al., 2004).

#### A.4.- Localización en tejidos y órganos.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieron la amplificación mediante PCR de los genes *AtTRXf1*, *f2* y *m1*, *m2*, *m3* y *m4*, y la zona proximal de sus secuencias reguladoras, 1000 pb aguas arriba del punto del inicio de la transcripción. Mediante el sistema Gateway® dichos fragmentos fueron fusionados al gen codificante para la proteína GFP en el vector pGWB4 (figura 15). A cada una ellas se le denominó en función del fragmento fusionado, obteniéndose las construcciones *f1::GFP*, *f2::GFP*, *m1::GFP*, *m2::GFP::GFP*, *m3::GFP* y *m4::GFP*.



Figura 29.- Estructura general de las construcciones que portan la fusión traduccional de las secuencias promotoras más los genes codificantes de las TRXs *f* y *m* de *A. thaliana*. *AttB1* y *AttB2*: regiones de recombinación para la subclonación; *P*: región promotora de cada gen; *TRXs*: secuencias génicas correspondientes a los genes *AtTRXf1*, *AtTRXf2*, *AtTRXm1*, *AtTRXm2*, *AtTRXm3* y *AtTRXm4*.

Posteriormente, con las construcciones generadas se transformaron plantas de *A. thaliana* (ecotipo Col0) y se obtuvieron semillas transgénicas que fueron seleccionadas hasta la obtención de las correspondientes líneas homocigotas. Para cada construcción se seleccionaron sólo las líneas con una única inserción de T-DNA (seleccionando las líneas que presentaron los porcentajes de segregación correspondientes en medio selectivo con kanamicina) y se continuó el estudio con una de las líneas homocigotas que mostraron repetitividad en el patrón de expresión en observaciones al microscopio confocal. Estas líneas se denominaron de igual forma que las construcciones con las que fueron transformadas.

Mediante la técnica de *western-blotting*, y usando el anticuerpo específico GFP que reconocía a la proteína del mismo nombre, se comprobó que las líneas homocigotas seleccionadas contenían las correspondientes proteínas quiméricas tras la inmunolocalización de banda de unos 39 kDa, tal y como se muestra en la figura 30.

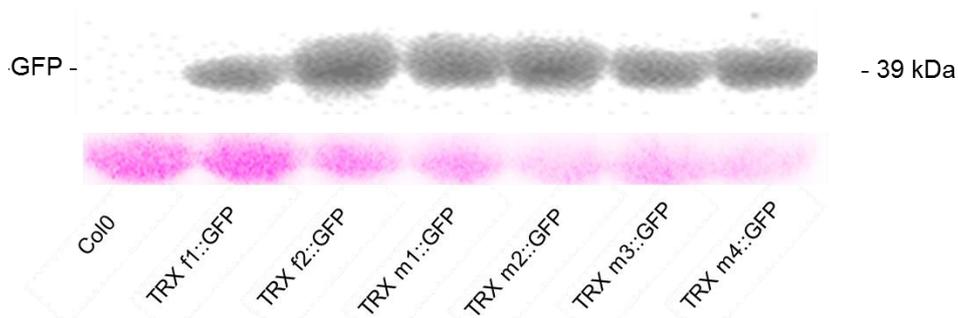


Figura 30.- Inmunodetección por *western-blotting* de las proteínas de fusión en las distintas líneas transgénicas *f1::GFP*, *f2::GFP*, *m1::GFP*, *m2::GFP*, *m3::GFP* y *m4::GFP*, utilizando el anticuerpo anti GFP. La proteína soluble se extrajo de hojas de roseta de cada una de las líneas transgénicas obtenidas, se cuantificó y se analizó utilizando 40  $\mu$ g. Como control de carga se muestra la banda correspondiente a la subunidad mayor de la RUBISCO teñida con solución de rojo Ponceau.

Para la observación con el microscopio confocal de cotiledones, hipocotilos y radículas se tomaron plántulas de 2-3 dpv cultivadas en medio 0,5x MS. En el caso de raíces maduras, éstas se tomaron de plantas de 10 dpv cultivadas en las mismas condiciones. Las flores y semillas observadas procedieron de plantas maduras cultivadas en tierra bajo condiciones de día largo.

#### A.4.1.- Localización de TRXsf.

La correcta expresión de las fusiones traduccionales TRXf1::GFP y TRXf2::GFP se confirmó mediante la observación de la señal GFP en cloroplastos de células del mesófilo esponjoso de hojas de roseta. En las figuras 31A y 32A se muestra claramente la localización cloroplastídica para ambas TRXs. Sin embargo, a diferencia de TRXf1::GFP, habría que destacar la sorprendente localización dual cloroplasto-citosol de la fusión TRXf2::GFP, no descrita anteriormente en la bibliografía. De la misma forma que en el mesófilo, en el tejido de la epidermis se confirmó la presencia de ambas isoformas en cloroplastos de las células guarda de los estomas (Figuras 31B y 32B). En plántulas de *Arabidopsis* de 10 dpv, cultivadas *in vitro*, se apreció señal de fluorescencia en el hipocotilo y en la radícula, que si bien estaban expuestas a luz durante el ciclo de crecimiento, ya que el medio MS sólido es translúcido, no se estimuló la fotomorfogénesis de plastidios fotosintéticos (Figuras 31C y 32C).

Además de en órganos fotosintéticos, la presencia de estas proteínas se confirmó en órganos heterotróficos como las raíces y las inflorescencias y en las semillas en desarrollo. En raíces habría que destacar el diferente patrón de localización que mostraron las distintas isoformas estudiadas (Figuras 31D y 32D). Mientras que la señal de TRXf1::GFP aparecía principalmente en la zona de división de la raíz, TRXf2::GFP se encontraba principalmente expresada en la zona de elongación, fuera de la zona meristemática con una activa división celular.

De la observación de las flores (Figuras 31G y 32G) se constató la presencia de ambas isoformas en estos órganos reproductores. La señal de TRXf1::GFP apareció en estambres (en filamentos y anteras) y en el estigma. A diferencia de TRXf1::GFP, la presencia en sépalos de TRXf2::GFP se pudo observar a nivel de vasos conductores y en la región periférica, mientras que en los pétalos (Figuras 31E y 32E) la señal de fluorescencia se limitó a la parte que estaba en contacto con el receptáculo de la flor.

En silicuas se apreció una distribución homogénea de ambas TRXs *f* en las valvas (carpelos), siendo aparentemente más intensa en la parte del estigma, posiblemente debido a la presencia de granos de polen adheridos, los cuales tienen la particularidad de emitir fluorescencia inespecífica proveniente de

compuestos de la pared del mismo (Figuras 31H y 32H). Dentro de las silicuas, las semillas en desarrollo en los estadios lineal y globular mostraron un patrón general de expresión tanto para *TRXf1::GFP* como para *TRXf2::GFP*, respectivamente (Figuras 31I y 32I).

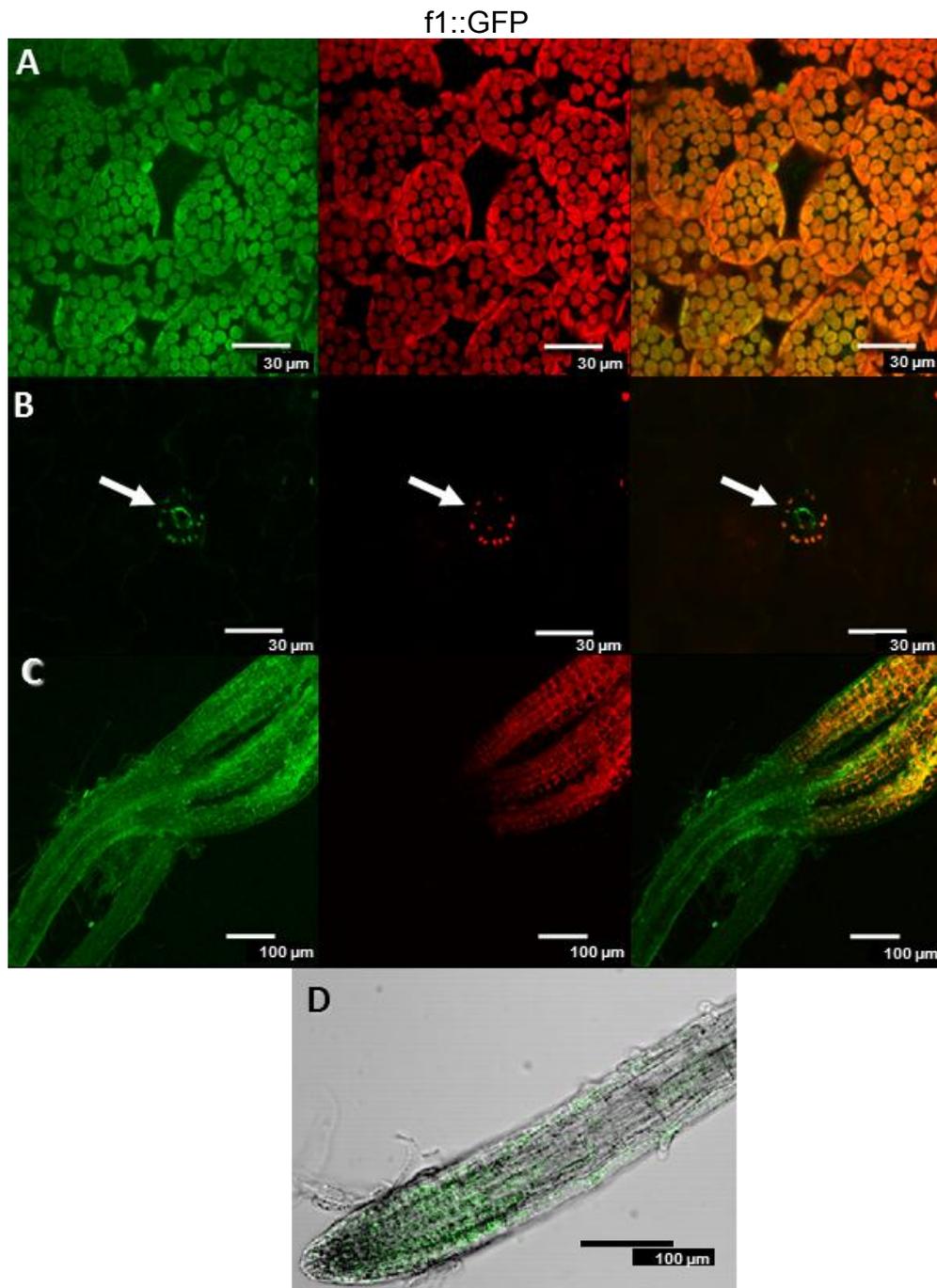


Figura 31.- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión *AtTRXf1::GFP* en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo (A) y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (B, flechas), región del hipocotilo (C) y región apical de la raíz (D). Escala de las barras: B= 30 μm; A = 50 μm; C y D = 100 μm.

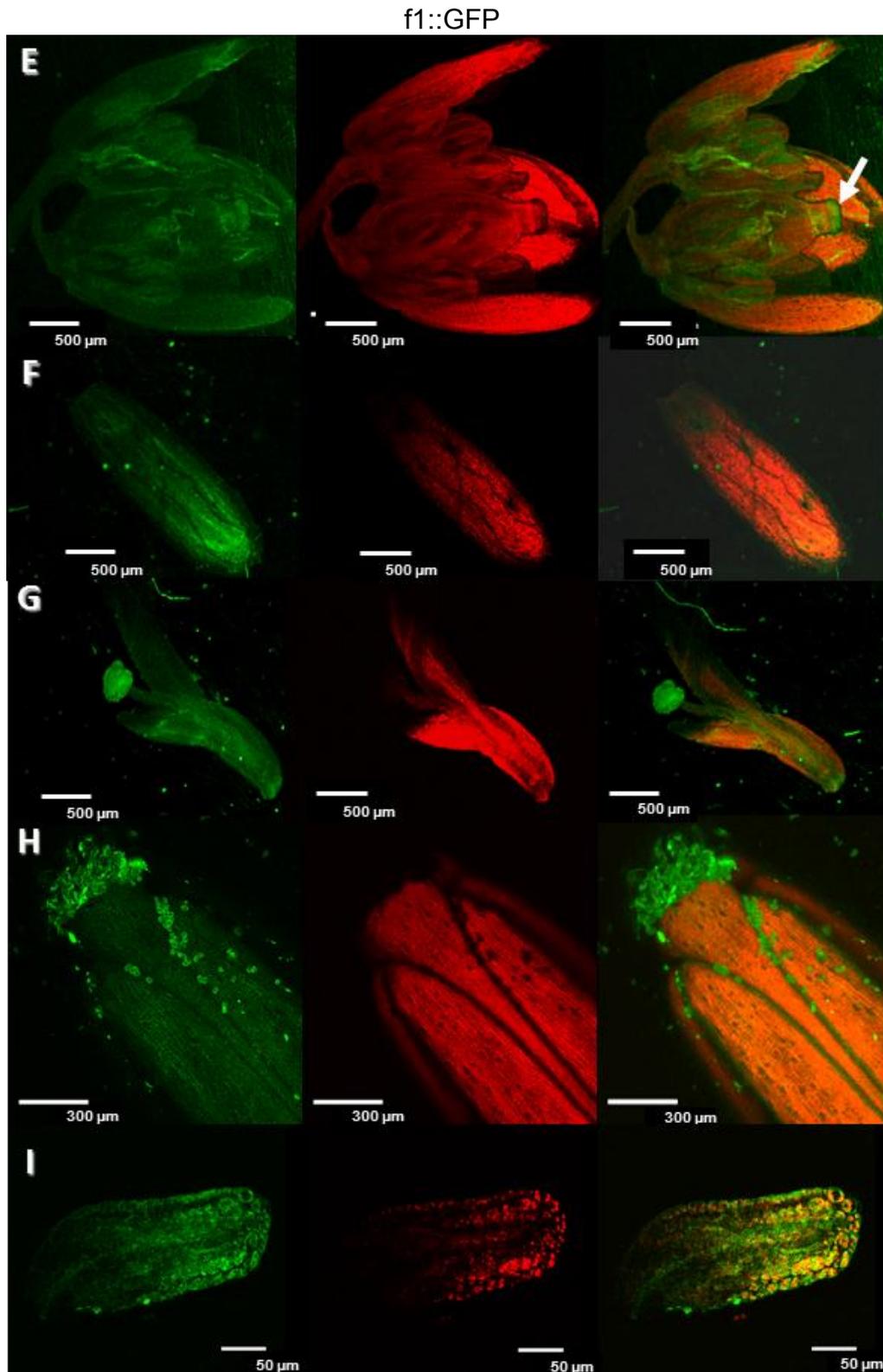


Figura 31 (continuación).- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión *AtTRXf1::GFP* en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: sépalo (E); disección en la que se muestra estigma, estilo, ovario y pétalos (F); flor completa, con detalle de estigma (G, flecha); parte apical de silicua (H), semilla con embrión en estado de desarrollo temprano de cotiledon lineal (I). Escala de las barras: I = 50  $\mu\text{m}$ ; E, F G y H = 500  $\mu\text{m}$ .

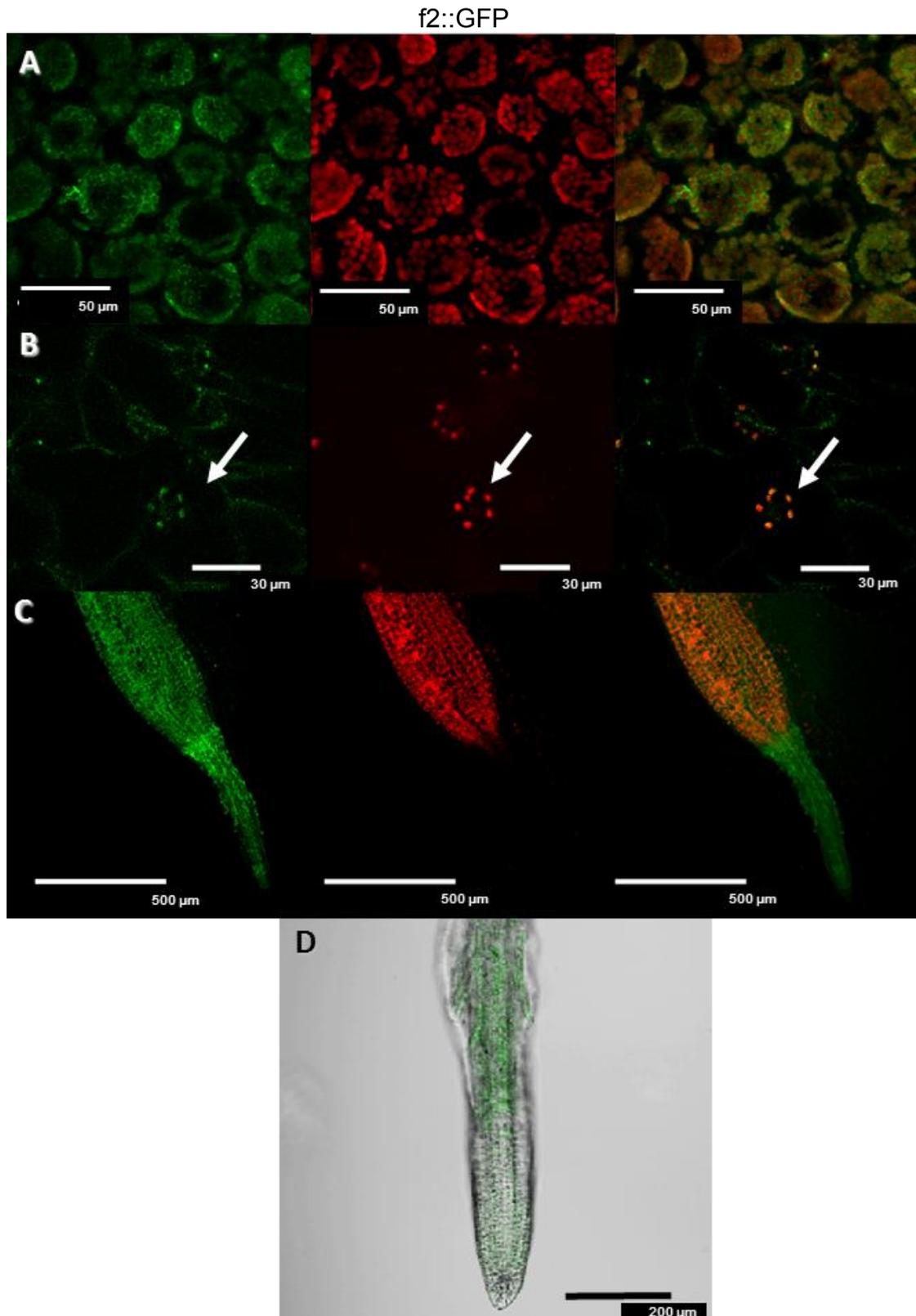


Figura 32.- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRXf2::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo (A) y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (B, flechas), región del hipocotilo (C) y región apical de la raíz (D). Escala de las barras: B=30 μm; A= 50 μm; D=200 μm; C= 500 μm.

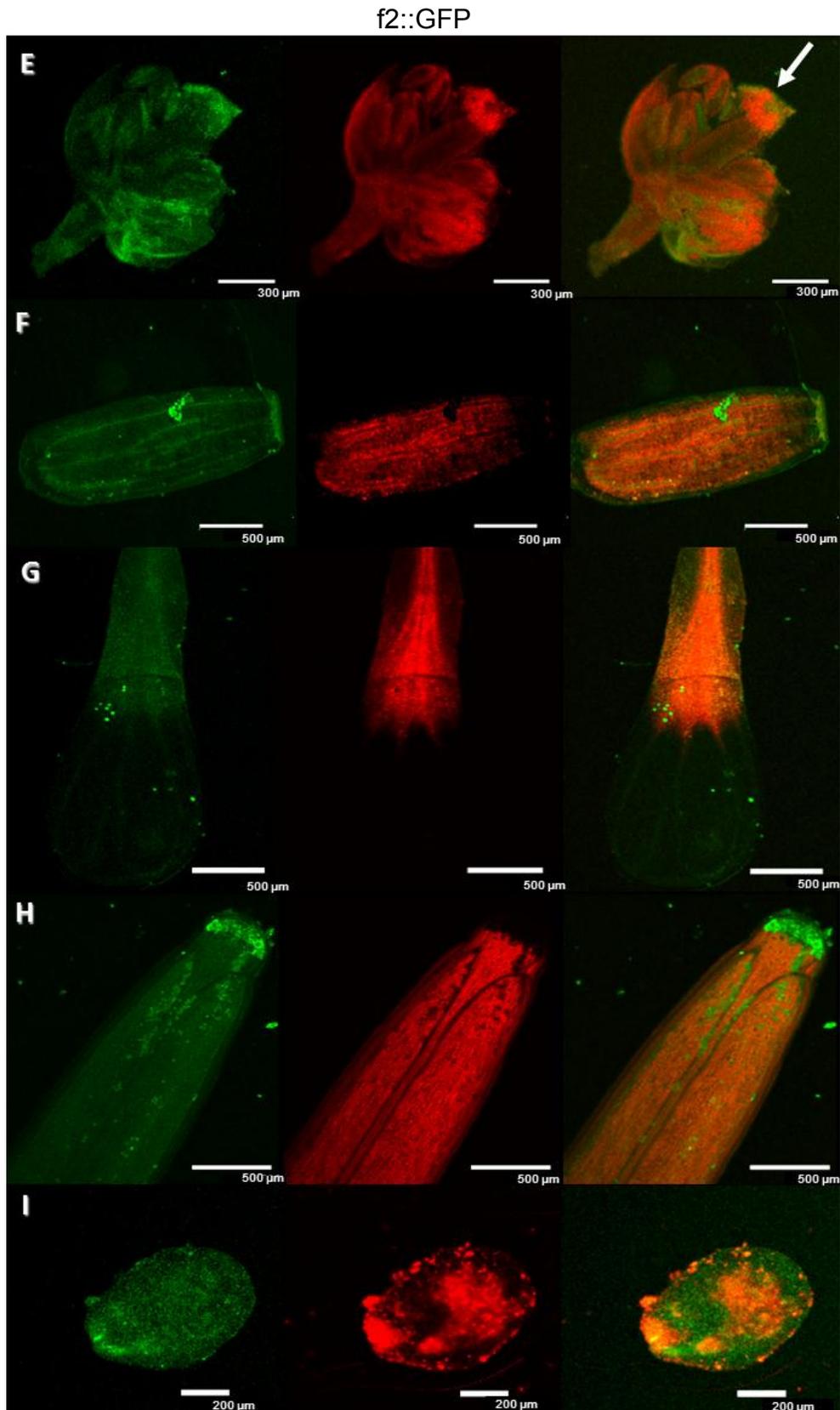


Figura 32 (continuación).- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión *AtTRXf2::GFP* en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: flor completa, con detalle de óvulo (E, flechas); sépalo (F); pétalo (G); parte apical de silicua (H) y semilla (I). Escala de las barras: I = 200  $\mu\text{m}$ ; E = 300  $\mu\text{m}$ ; F, G y H = 500  $\mu\text{m}$ .

#### A.4.2.- Localización de TRXsm.

Las imágenes capturadas con el microscopio confocal de las líneas con las construcciones TRX*m*::GFP confirmaron la presencia de TRXs *m* en los cloroplastos del mesófilo de la hoja (Figuras 33A, 34A, 35A y 36A). Esta misma observación se realizó en los cloroplastos de las células guarda de los estomas, como se muestra en las figuras 33B, 34B, 35A y 36B. A pesar de la baja expresión de TRX*m3* en órganos fotosintéticos, la señal emitida por TRX*m3*::GFP, al igual que para TRX*m2*::GFP, fue perfectamente observable en los cotiledones de plántulas de 10 dpv (Figuras 34B y 35C).

Del mismo modo que para las TRXs *f*, la expresión de las TRXs *m* también se localizó en tejidos de órganos no fotosintéticos como flores, semillas, silicuas y raíces.

En plantas maduras de 25 dpv se visualizó fluorescencia en las flores de las líneas m1::GFP (Figura 33E), m2::GFP (Figuras 34C y 34D) y m3::GFP (Figura 35F). Esta señal resultó más intensa en las células germinales periféricas de la antera que en filamentos para las líneas m2::GFP y m3::GFP, mientras que en las líneas m1::GFP y m4::GFP esta señal fue más homogénea en estambres. Así mismo, se constató la presencia en sépalos y pétalos en las líneas m1::GFP (Figuras 33C y 33D), m3::GFP (Figuras 35G y 35H) y m4::GFP (Figuras 36C y 36D). Mientras que la fusión TRX*m1*::GFP emitió una señal homogénea y de poca intensidad en las partes vegetativas de la flor, la señal procedente de TRX*m3*::GFP destacó en haces vasculares y la de TRX*m4*::GFP se observó principalmente en la parte distal de los sépalos y en la zona de inserción de los sépalos al receptáculo de la flor.

En semillas pudo observarse señal TRX*m*::GFP en distintos momentos del desarrollo. En los estadios iniciales, la señal emitida por TRX*m1*::GFP se localizó en la zona que limita la gran vacuola central y no estaba asociada a la presencia de clorofila (Figura 33H). En el estadio “torpedo”, TRX*m2*::GFP se expresaba por toda la semilla, tanto en embrión como en endospermo (Figura 34G). Por último, tanto TRX*m3*::GFP como TRX*m4*::GFP mostraron su expresión en el embrión de semillas en estadio “corazón” y en el resto de tejidos no embrionarios de la semilla en desarrollo (Figuras 35J, 36G, 36H). Además, se observó señal de

TRX*m4*::GFP en embrión en fase de “cotiledón linear”, cuando se inicia la acumulación de clorofila en los cotiledones y en el eje embrionario, co-localizando este pigmento con la señal GFP (Figura 36I).

En las valvas de las silicuas (con capacidad fotosintética), la señal de las fusiones TRX*m*::GFP se encontró uniformemente distribuida (Figuras 33F, 33G, 34E, 34F, 35I y 36F)., siendo especialmente intensa en la zona apical de la misma (estigma del pistilo), aunque la especificidad de esta emisión de fluorescencia habría que cuestionarla por la razón ya mencionada anteriormente para el polen.

A nivel de raíces, se halló señal de TRX*m1*::GFP en la epidermis y la columnela del meristemo apical (Figura 33I). La fluorescencia de TRX*m2*::GFP se apreció en meristemos, tanto primarios como secundarios (Figuras 34H y 34C) y en tejidos de la zona madura de la raíz como el córtex y el cilindro vascular central. El patrón de localización en raíz de TRX*m3*::GFP y TRX*m4*::GFP fue muy similar al de TRX*m2*::GFP, especialmente el de TRX*m3*::GFP, destacando, a diferencia de las dos anteriores, la intensa señal de TRX*m4*::GFP en el cilindro vascular (Figuras 36H, 36E y 36K).

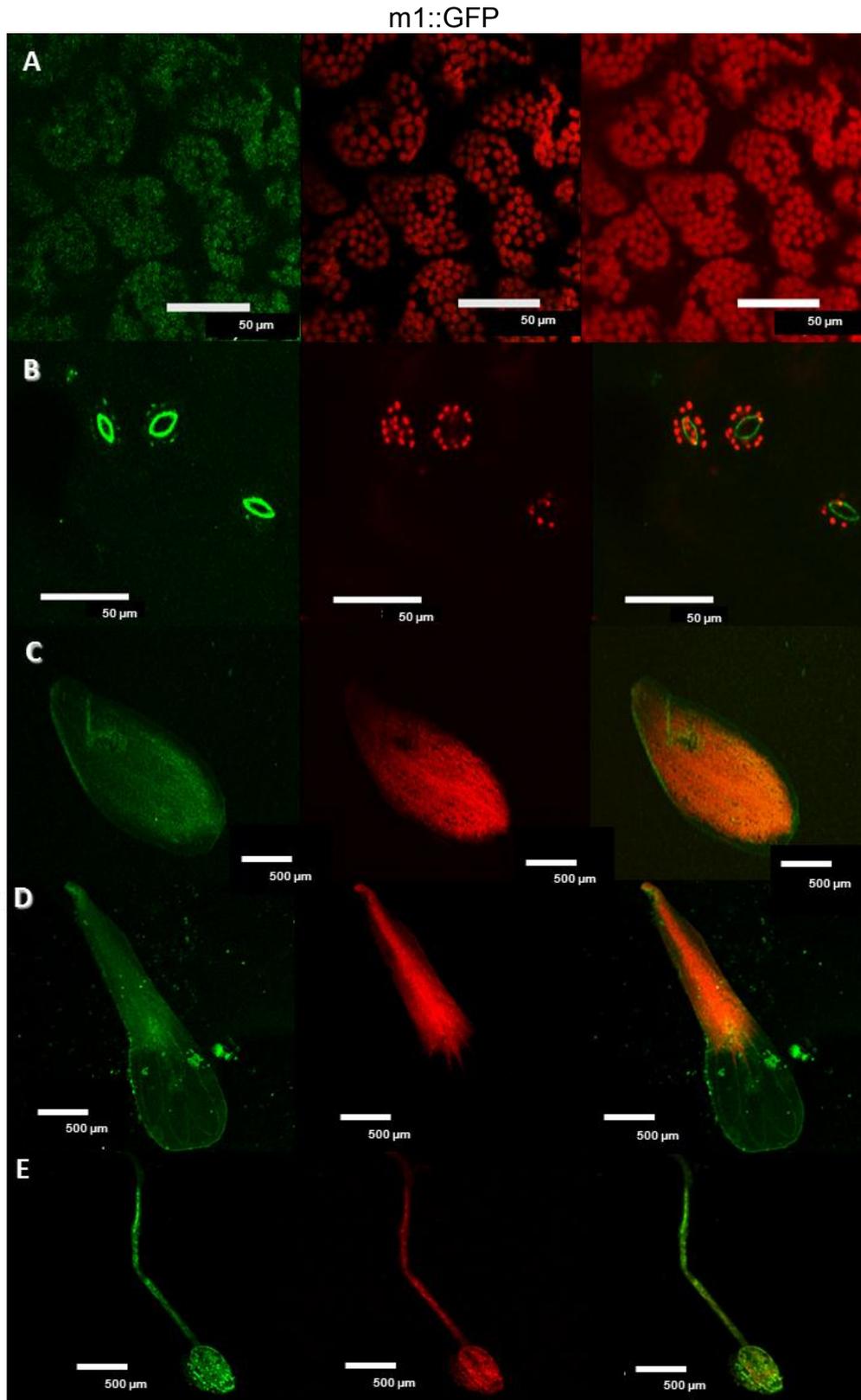


Figura 33.- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRX *m1::GFP* en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo (A) y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (B); sépalos (C); pétalos (D) y filamento y antera (E). Escala de las barras: A y B = 50 μm; C, D y E = 500 μm.

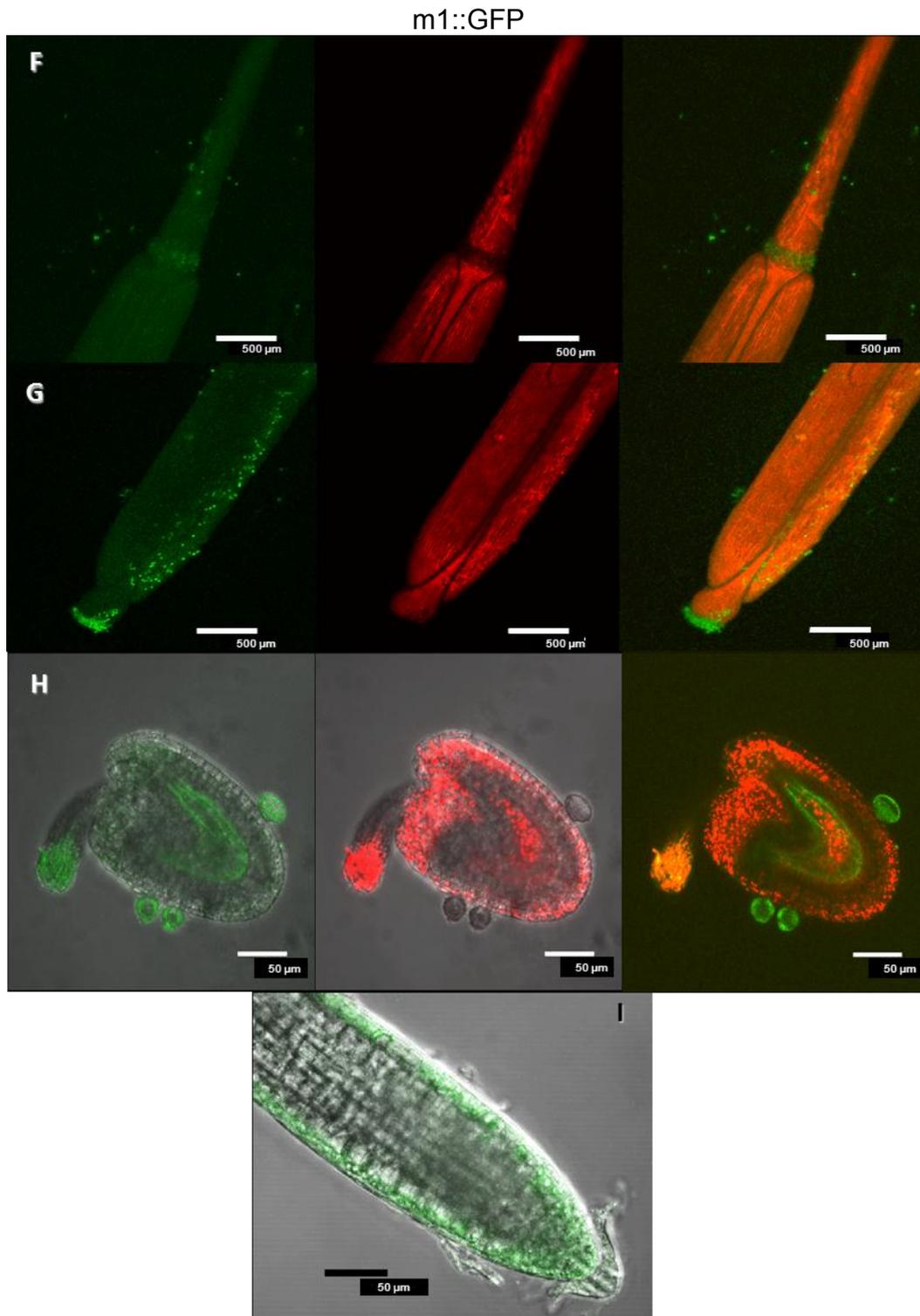


Figura 33 (continuación).- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRX m1::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: parte basal (F) y apical (G) de la silicua; semilla madura, con embrión en su interior (H) y región apical de la raíz (I). Escala de las barras: 50 μm (H, I) y 500 μm (G, F).

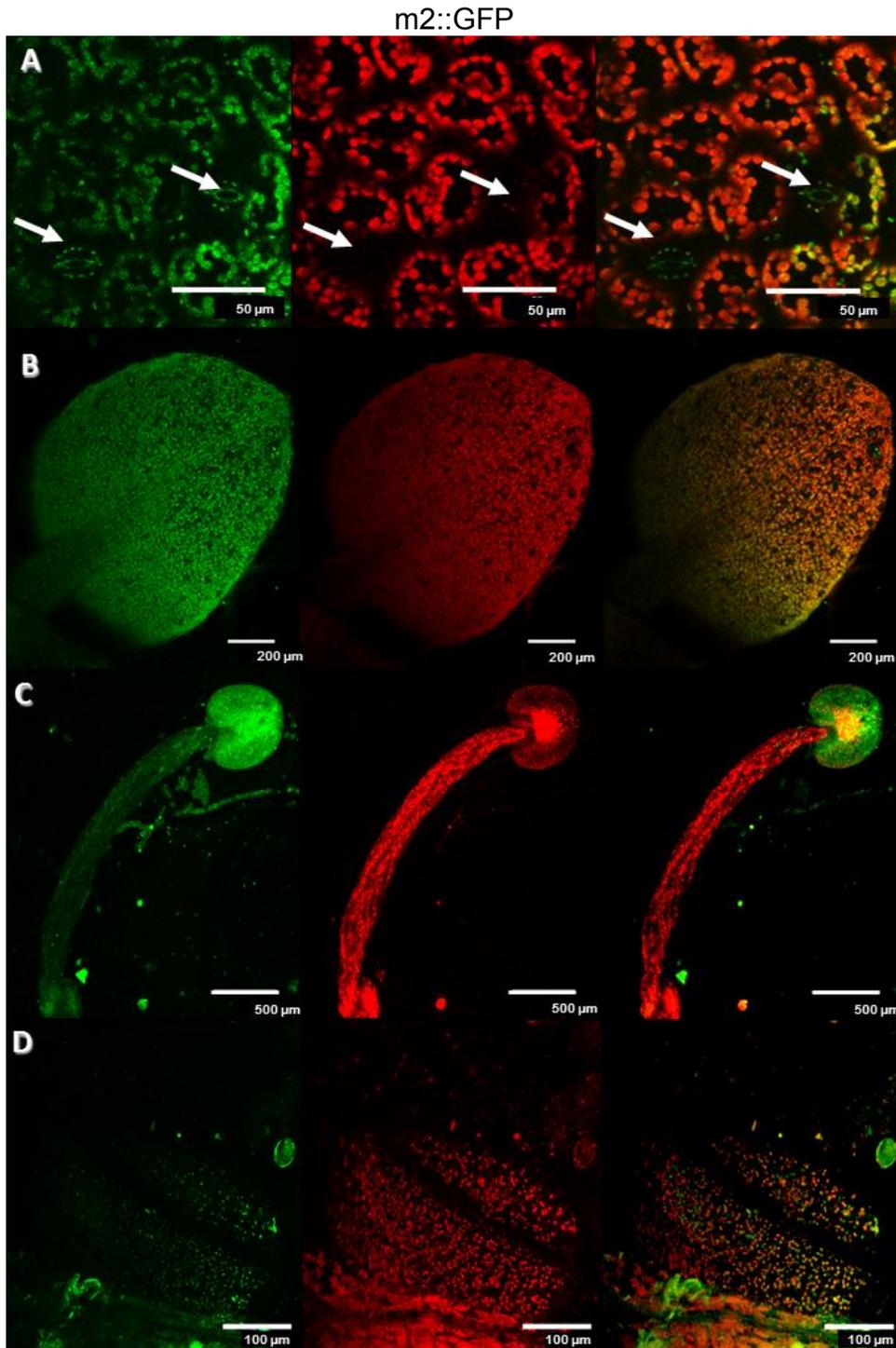


Figura 34.- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión *AtTRXm2::GFP* en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (A, flechas); cotiledón (B); antera y filamento (C) y detalle de antera (D). Escala de las barras: A = 50 μm; D = 100 μm; B = 200 μm; C = 500 μm.

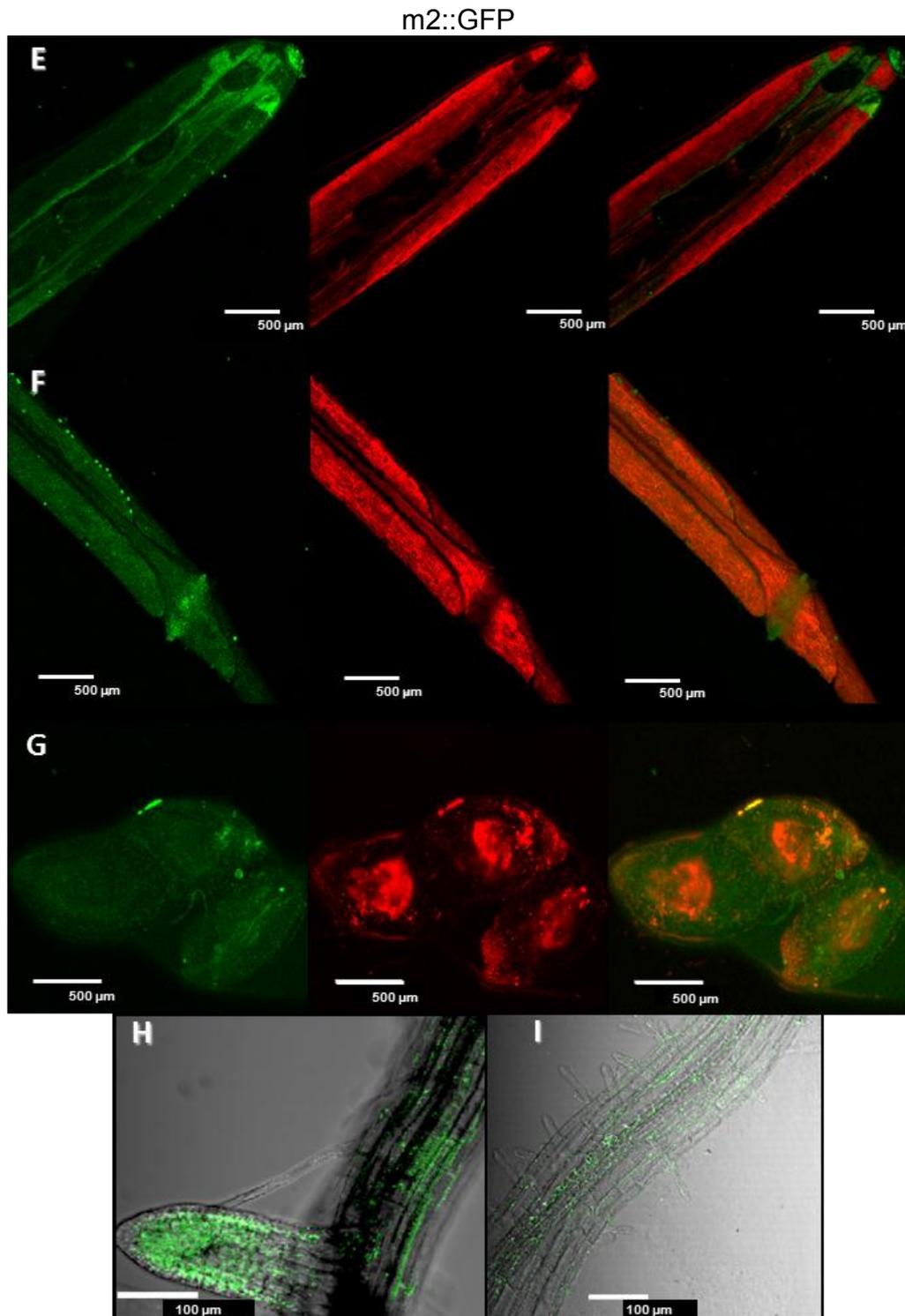


Figura 34 (continuación).- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRXm2::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: parte apical (E) y basal (F) de la silicua; semillas maduras, con embrión en su interior (G); raíz secundaria (H) y raíz principal (I). Escala de las barras: H e I = 100 μm; E, F y G = 500 μm.

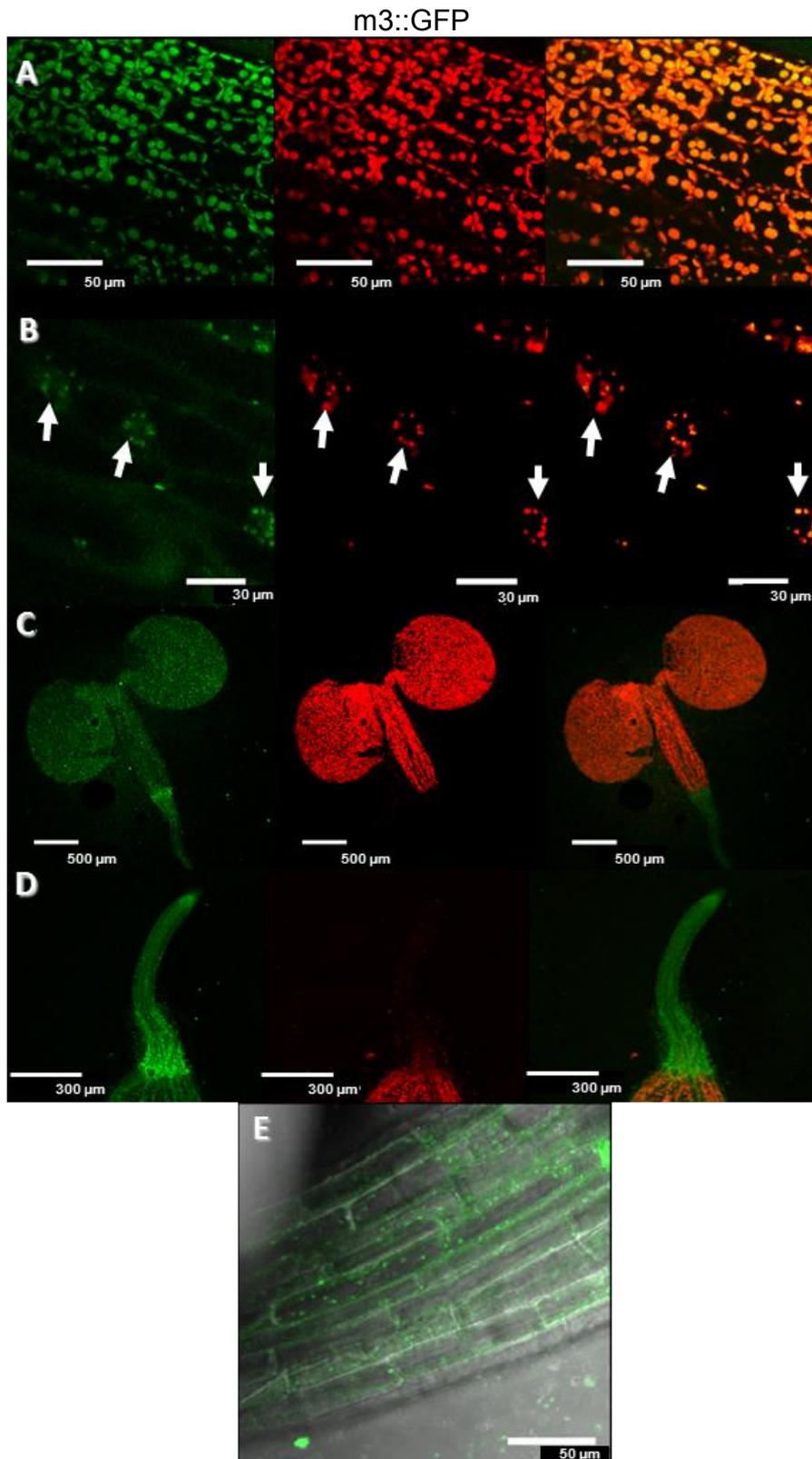


Figura 35.- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRX *m3::GFP* en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo (A) y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (B); cotiledones (C) zona de hipocotilo y radícula (D) de plántulas y región media de la raíz (E). Escala de las barras: B = 30 μm; A y E = 50 μm; D = 300 μm; C = 500 μm.

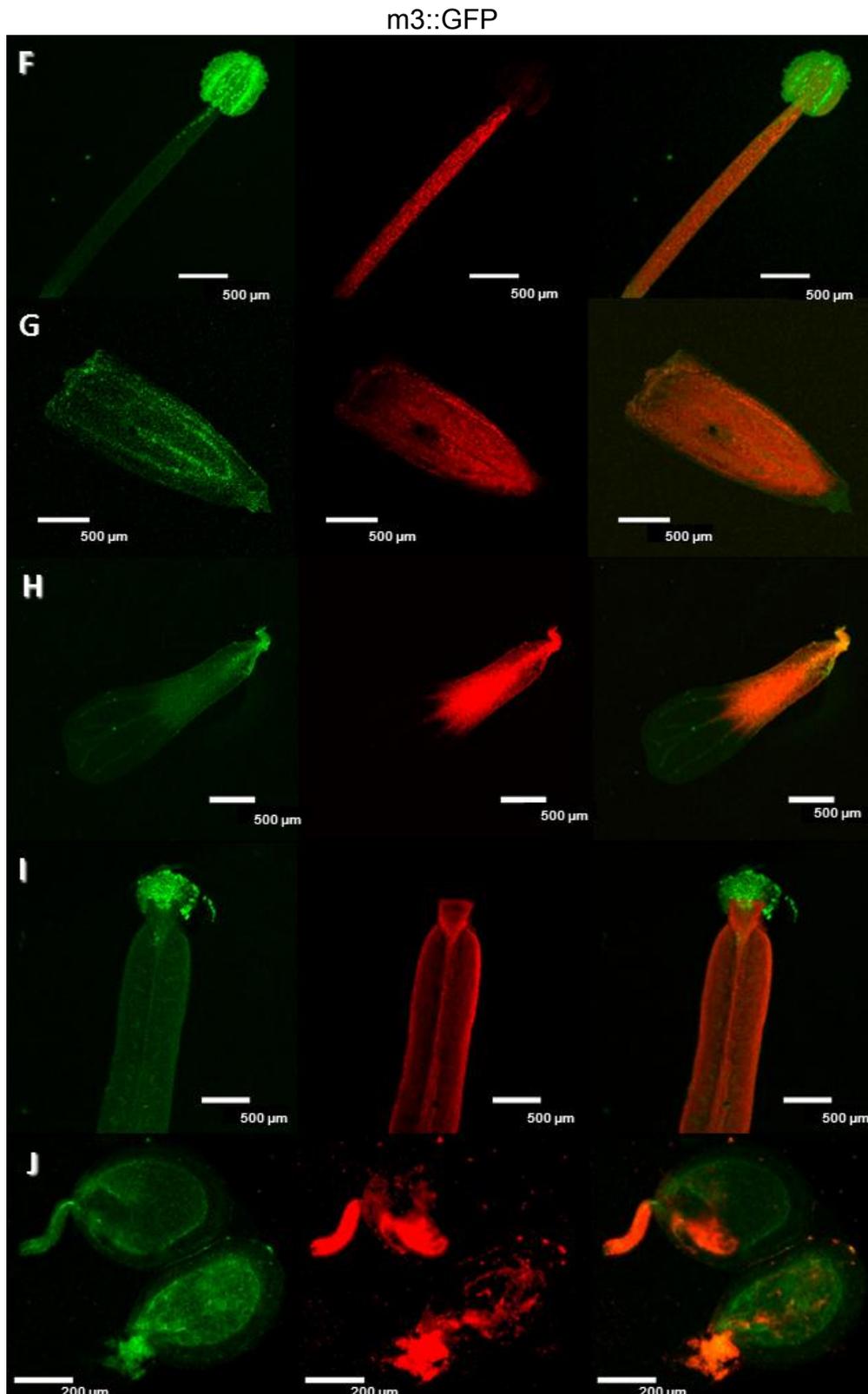


Figura 35 (continuación).- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión *AtTRXm3::GFP* en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: antera y filamento (F); sépalo (G); pétalo (H); parte apical de silícula, mostrando semillas inmaduras a través de las valvas (I) y semillas maduras, con embrión en su interior (J). Escala de las barras: J = 200  $\mu\text{m}$ ; F, G, H e I = 500  $\mu\text{m}$ .

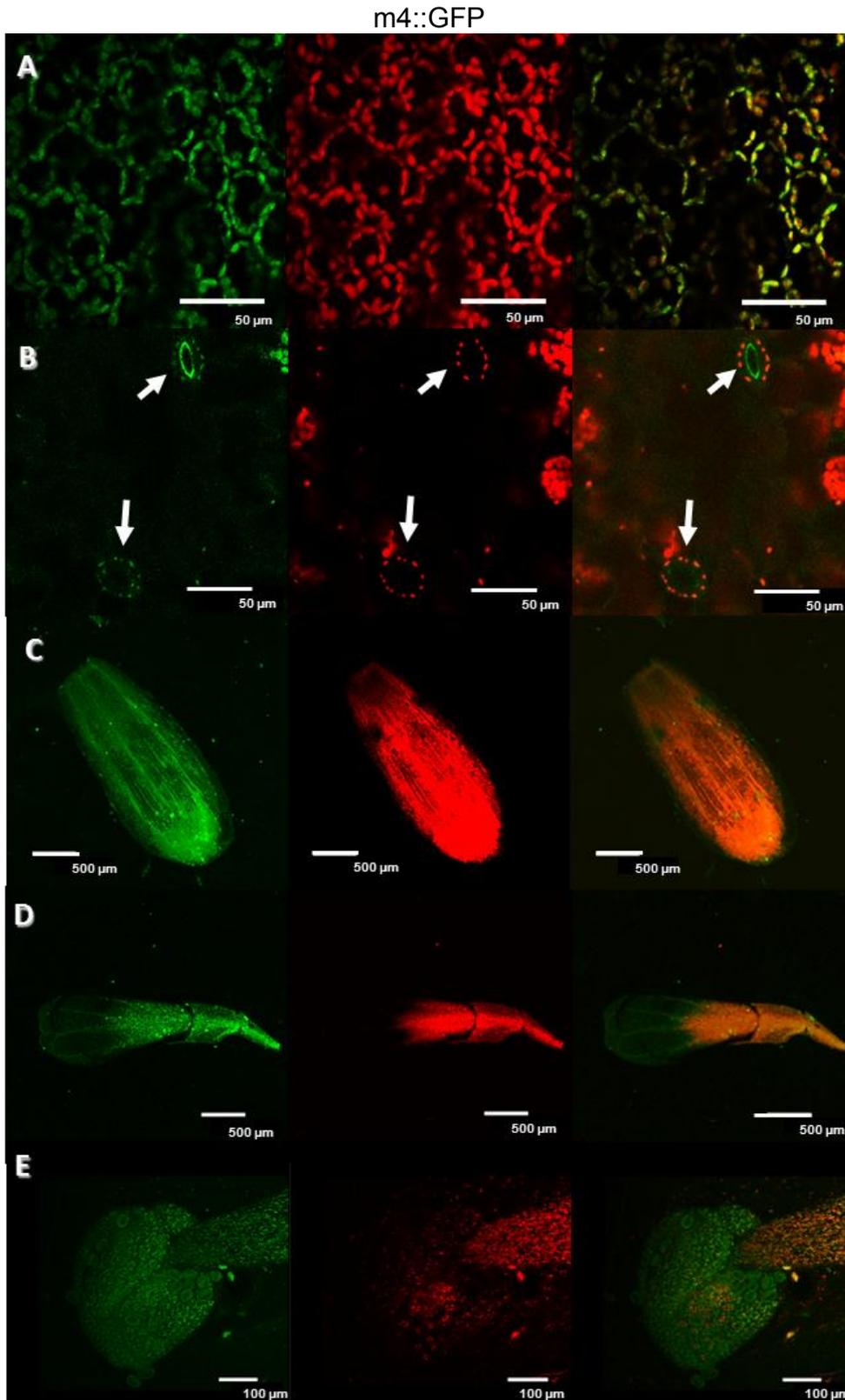


Figura 36.- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión *AtTRXm4::GFP* en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo (A) y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (B); sépalos (C); pétalos (D) y detalle de antera y filamento (E). Escala de las barras: A y B = 50 μm; E = 100 μm; C y D = 500 μm.

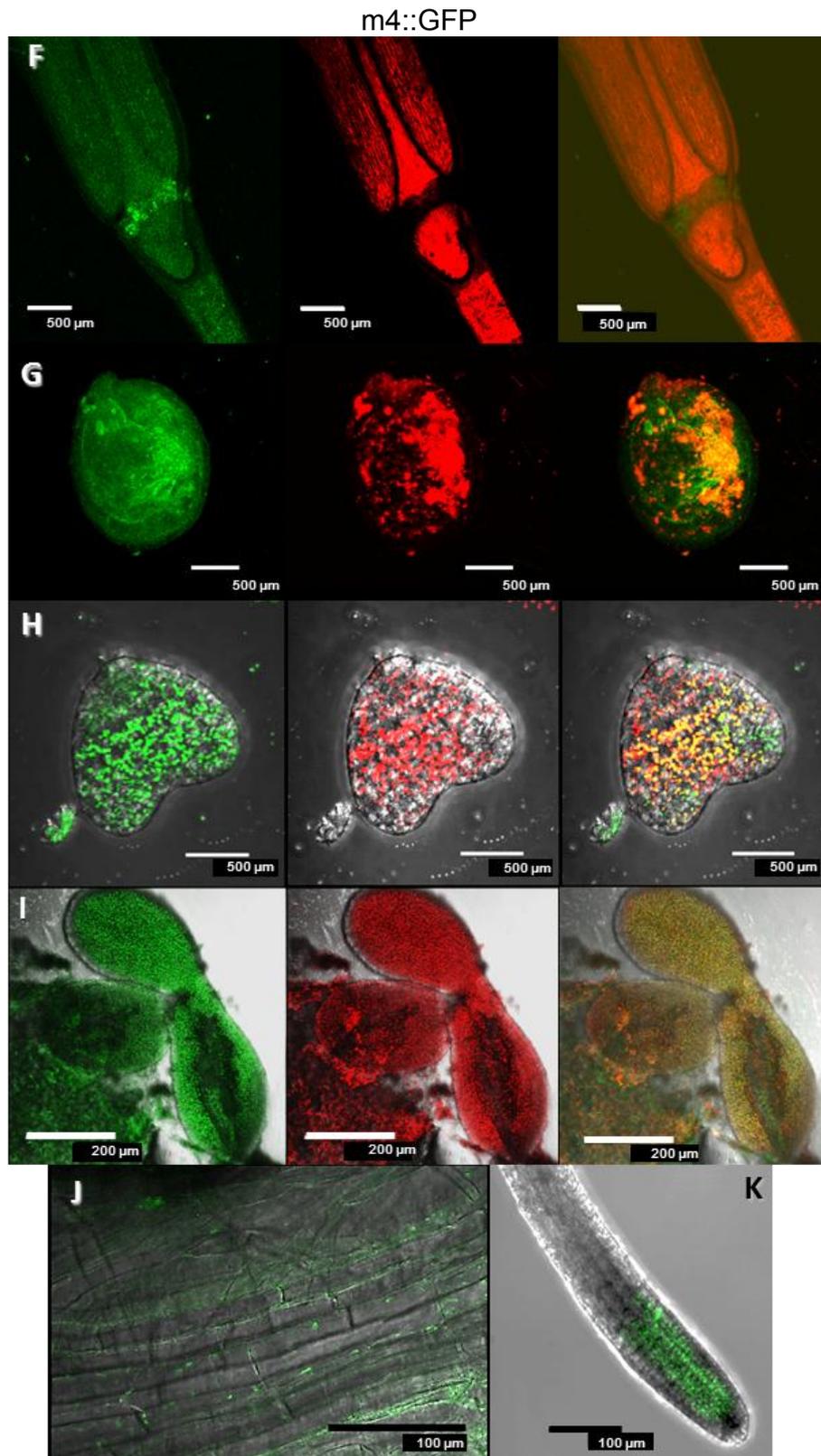


Figura 36 (continuación).- Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRX m4::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: parte basal de la silícula (F); semilla madura (G); embriones en estadio corazón (H) y estadio maduro (I); detalle de zona de elongación de la raíz (J) y ápice de la misma (K). Escala de las barras: H e I = 100 µm (H, I); E, F y G = 500 µm.

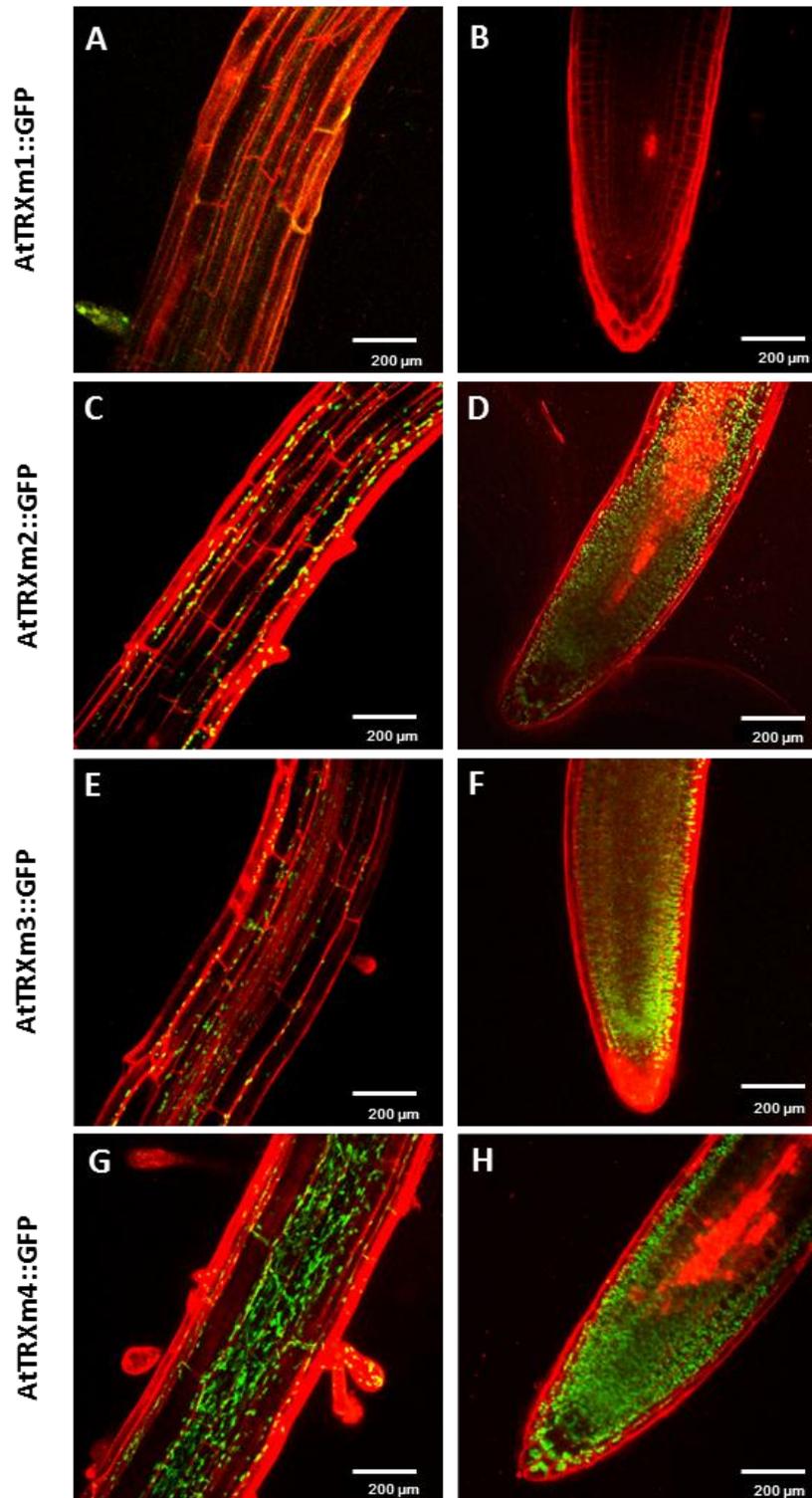


Figura 37.- Localización mediante microscopía confocal de las proteínas de fusión *AtTRXm1::GFP*, *AtTRXm2::GFP*, *AtTRXm3::GFP* y *AtTRXm4::GFP* en raíces de 10 días, después de germinación procedentes de líneas transgénicas de *A.thaliana*. De forma previa a su análisis, las raíces fueron tratadas con yoduro de propidio durante 5 minutos. Parte media (A, C, E, G) y parte apical (B, D, F y H). Escala de las barras: 200 μm.

## B.- Estudios *in vitro* con las formas purificadas de las TRXs *f* y *m* de *Arabidopsis*.

### B.1.- Expresión y purificación de TRXs recombinantes.

Las secuencias codificantes de las TRXs *f* y *m* se obtuvieron a partir del material muestreado de hojas de roseta de plantas de *A. thaliana*. Tras la clonación en el vector de expresión pET28b y una vez confirmada la ausencia de mutaciones en la secuencia de los marcos abiertos de lectura (sin el péptido señal), se procedió a la expresión heteróloga en *E. coli* BL21 y a la posterior purificación por cromatografía de afinidad de las TRXs *f* y *m*.

Las TRXs purificadas no mostraron la presencia de proteínas contaminantes después de migrarlas en un gel SDS-PAGE y teñirlas con Coomassie (Figura 38).

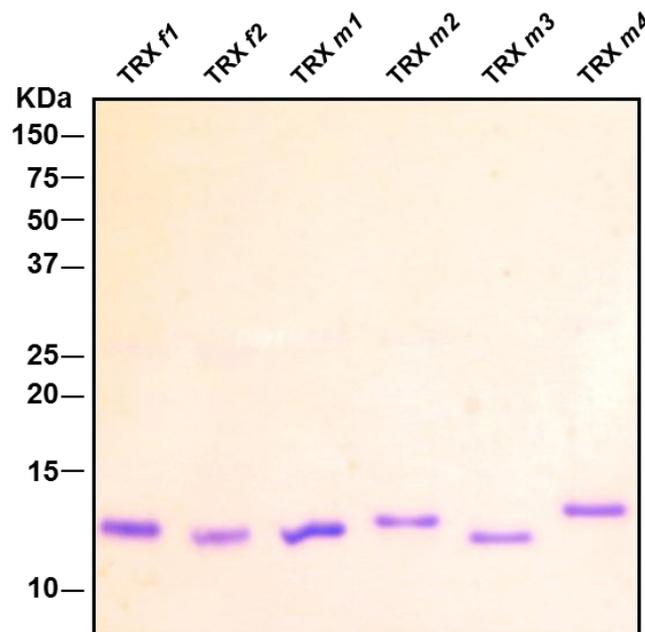


Figura 38.- Electroforesis SDS-PAGE (15% acrilamida) de las TRXs purificadas. Para la tinción de las proteínas se empleó el azul Coomassie.

La actividad redox de las TRXs recombinantes purificadas fue confirmada mediante ensayo de reducción de insulina (Figura 39). En dicho ensayo se observó que la actividad reductasa de las TRXs *m4* y *m2* fue claramente superior a la de las TRXs *f1*, *f2* y *m1*. La actividad de TRX*m3* fue significativamente más baja que la del resto de TRXs.

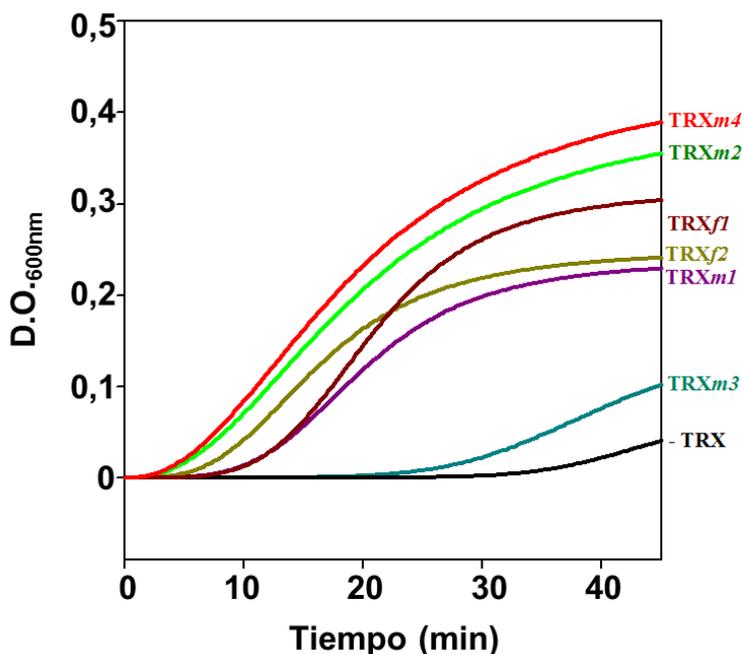


Figura 39.- Ensayo turbidimétrico de reducción de insulina por las TRXs recombinantes purificadas. Se muestra el incremento de densidad óptica (D.O.) a 600 nm registrados a lo largo del tiempo (min.) debido a la precipitación de la insulina.

## B.2.- Inmunodetección de las proteínas recombinantes purificadas.

Para analizar el grado de reconocimiento de los anticuerpos policlonales anti-PsTRX *f* y *m* de guisante, generados en un trabajo anterior (Barajas-López et al., 2007), se llevó a cabo un ensayo de *dot-blotting* con las distintas TRXs purificadas de Arabidopsis (Figura 40). En este ensayo se observó una mejor inmunodetección con el anticuerpo anti-PsTRX *f* de la proteína AtTRX *f2* que de la proteína AtTRX *f1*; sin embargo, y como se puede apreciar en la misma figura, estos anticuerpos fueron sensiblemente menos eficaces en el reconocimiento de las TRXs *f* de Arabidopsis.

La misma clase de ensayo fue realizado con las isoformas purificadas de AtTRX*m2* y AtTRX*m4*, poniendo en evidencia la discriminación en el reconocimiento de las TRX *m* de guisante *versus* las de Arabidopsis.

Estos análisis demostraron que los anticuerpos anti-PsTRX *f* y *m*, además de la inespecificidad en el reconocimiento de las distintas isoformas, tenían una menor afinidad antigénica, por lo que fueron descartados para su uso en Arabidopsis para análisis de expresión proteica.

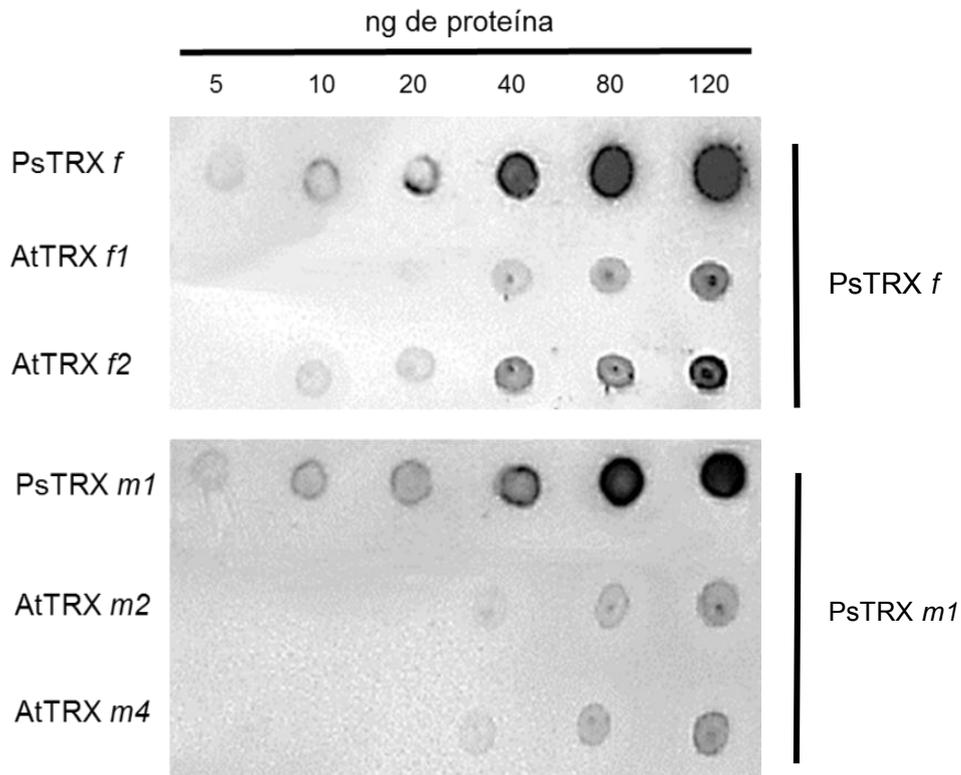


Figura 40.- Inmunodetección de las TRXs recombinantes purificadas usando los anticuerpos TRX *f* y TRX *m1* de guisante. Se ensayaron cantidades crecientes (en ng) de proteína. Como control se usaron las formas purificadas de PsTRX *f* y PsTRX *m1*.

### B.3.- Especificidad funcional de las TRXs *f* y *m* de Arabidopsis en la activación redox de la FBPasa.

Con objeto de determinar la especificidad funcional de las TRXs *f* y *m* en la activación de la isoforma de FBPasa que participa en el ciclo de Calvin (cFBP1), cuya reducción del puente disulfuro regulador provoca un incremento de la actividad a bajas concentraciones de  $Mg^{2+}$  (Figura 41A), se llevaron a cabo ensayos de activación con las TRXs recombinantes purificadas. La isoforma cFBP1 de las especies Arabidopsis y guisante, que fue también fueron expresadas mediante el vector pET28b y purificadas de manera similar a las TRXs, se encontraban disponibles en nuestro grupo de investigación y fueron utilizadas en ensayos de activación con las TRXs de Arabidopsis.

Debido a su distinta movilidad electroforética, los estados reducido y oxidado de cFBP1 pueden diferenciarse fácilmente en un gel SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

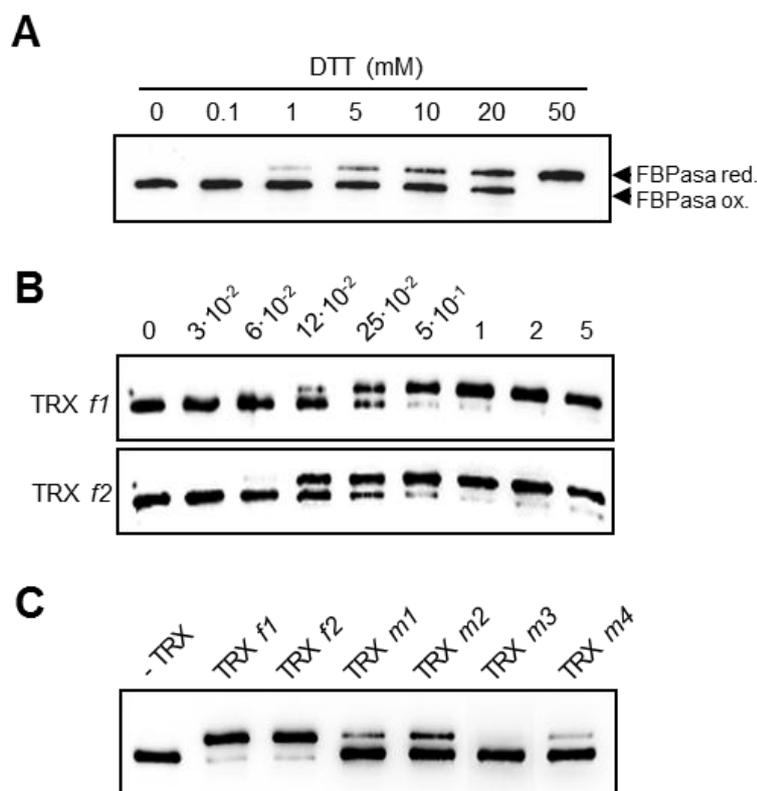


Figura 41.- Especificidad en la activación redox de la FBPasa mediada por las TRXs *f* y *m* de *A. thaliana*. (A) Diferencias en la movilidad electroforética de las formas reducida y oxidada de la FBPasa en ensayos de reducción con DTT. (B) Análisis comparativo de la capacidad reductora de cFBP1 de las isoformas TRX *f1* y *f2*. (C) Eficiencia relativa de las distintas isoformas de las TRXs *f* y *m* en la reducción de la FBPasa. Los valores indicados en la parte superior del panel B se refieren a las concentraciones en  $\mu\text{M}$  de la cantidad de TRX utilizada en los ensayos de reducción.

En la figura 41A se identifican los estados redox correspondientes a las dos bandas detectadas mediante *western-blotting* en un ensayo de reducción dependiente de DTT, siendo la forma oxidada del polipéptido la de mayor movilidad electroforética. Las figuras 41B y C y 42 muestran la especificidad de la activación redox mediada por TRX *f1* o TRX *f2* en presencia de 0,1 mM DTT. La máxima activación de la FBPasa se alcanzó a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  de TRX *f*. Aunque las curvas de activación con ambas TRXs *f* fueron similares, pueden apreciarse diferencias significativas en el grado de activación (tanto en ensayos de *western-blotting* como de actividad) a concentraciones del orden de 120 nM, mostrando TRX *f2* una mayor eficiencia que TRX *f1*. En los tiempos de ensayos utilizados, esta concentración de DTT fue insuficiente por si misma para reducir a la FBPasa. El análisis de la capacidad de activación por TRXs *m* mostró que las TRXs *m1* y *m2* eran las más eficientes en la reducción, seguidas por TRX *m4* (Figuras 41C).

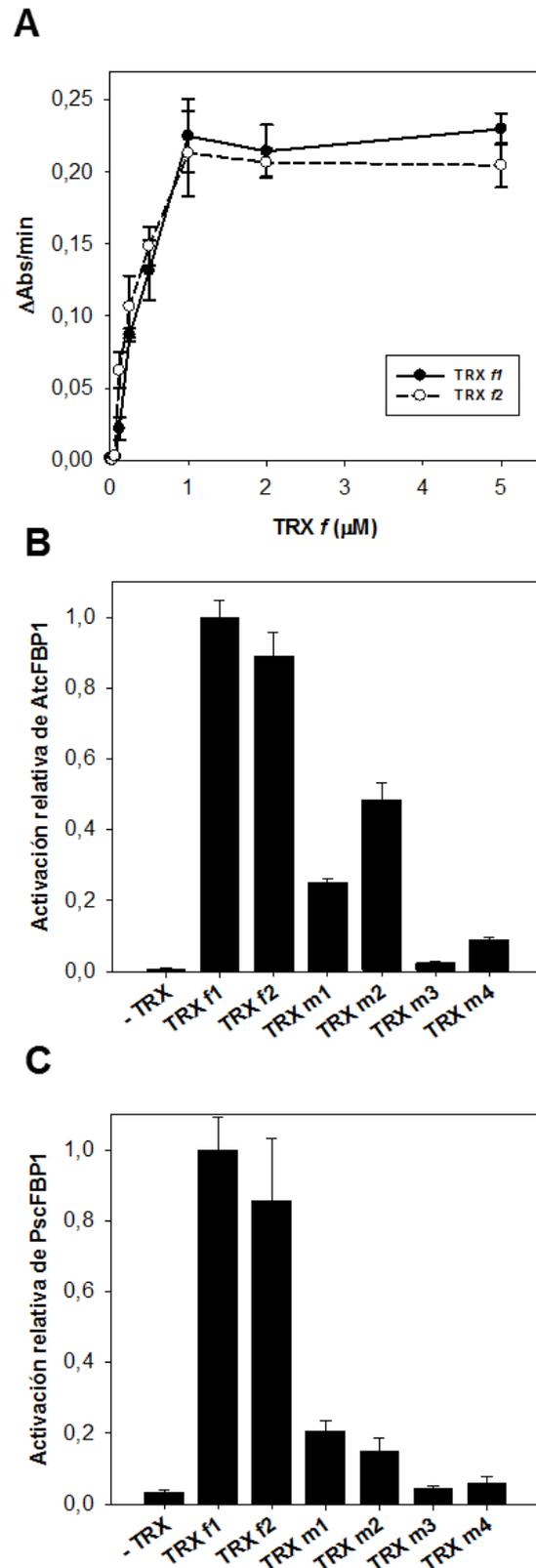


Figura 42.- Activación de la FBPasa por TRXs plastidiales. (A) Curva de activación de cFBP1 por concentraciones crecientes de TRX f1 y f2. (B) Actividad relativa de la FBPasa de *A. thaliana* en ensayos de activación con las diferentes TRXs f y m. (C) El mismo ensayo en que B con la FBPasa de guisante. Los ensayos de A y B se llevaron a cabo en las mismas condiciones que los utilizados en la figura 41B y C, respectivamente.

Los ensayos de actividad FBPasa mostraron resultados muy similares a los de *western-blotting*, tanto con la enzima de Arabidopsis como con la de guisante, si bien TRX *m3* no fue capaz de activar a la FBPasa en las condiciones ensayadas (Figura 42).

#### **B.4.- Búsqueda de dianas para las TRXs *f1* y *f2* en extractos de inflorescencias y raíces.**

Para poder llevar a cabo la búsqueda de dianas específicas de las TRX *f1* y TRX *f2* mediante cromatografía de afinidad, se sustituyó una de las cisteínas del sitio activo (C35) por serina. Las proteínas recombinantes mutadas fueron obtenidas de manera similar a las proteínas silvestres correspondientes, se denominaron TRX *f1* CS y TRX *f2*CS y fueron utilizadas como “cebo”.

Las proteínas procedentes de los extractos proteicos de inflorescencias y raíces capturadas y eluidas fueron enviadas a la Unidad de Proteómica de la Universidad de Córdoba dónde se procedió a la identificación de las mismas. Para ello, la solución con las potenciales proteínas dianas se optimizó para su correcta separación en una electroforesis bidimensional. Tras la tinción con “*blue brilliant*” se pudieron visualizar en las proteínas en forma de *spots* (Figuras 44 y 46) que se seleccionaron a través del programa *PDQuest*® (Bio-rad). Tras ello se procedió a su recogida (“picado”) del gel y a su identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los péptidos diana y su descripción detallada obtenidos para la TRX *f1* y la TRX *f2* en raíz y en inflorescencias se recogen en las Tablas 11, 12 y 13 y 14 respectivamente .

El establecimiento de las categorías y de las funciones moleculares de las proteínas diana obtenidas y la determinación de las frecuencias normalizadas correspondientes, fueron determinadas mediante el uso de la aplicación *Classification SuperViewer* que utiliza los AGI de los genes y los compara en la base de datos de *Gene Ontology* (Provar and Zhu, 2003).

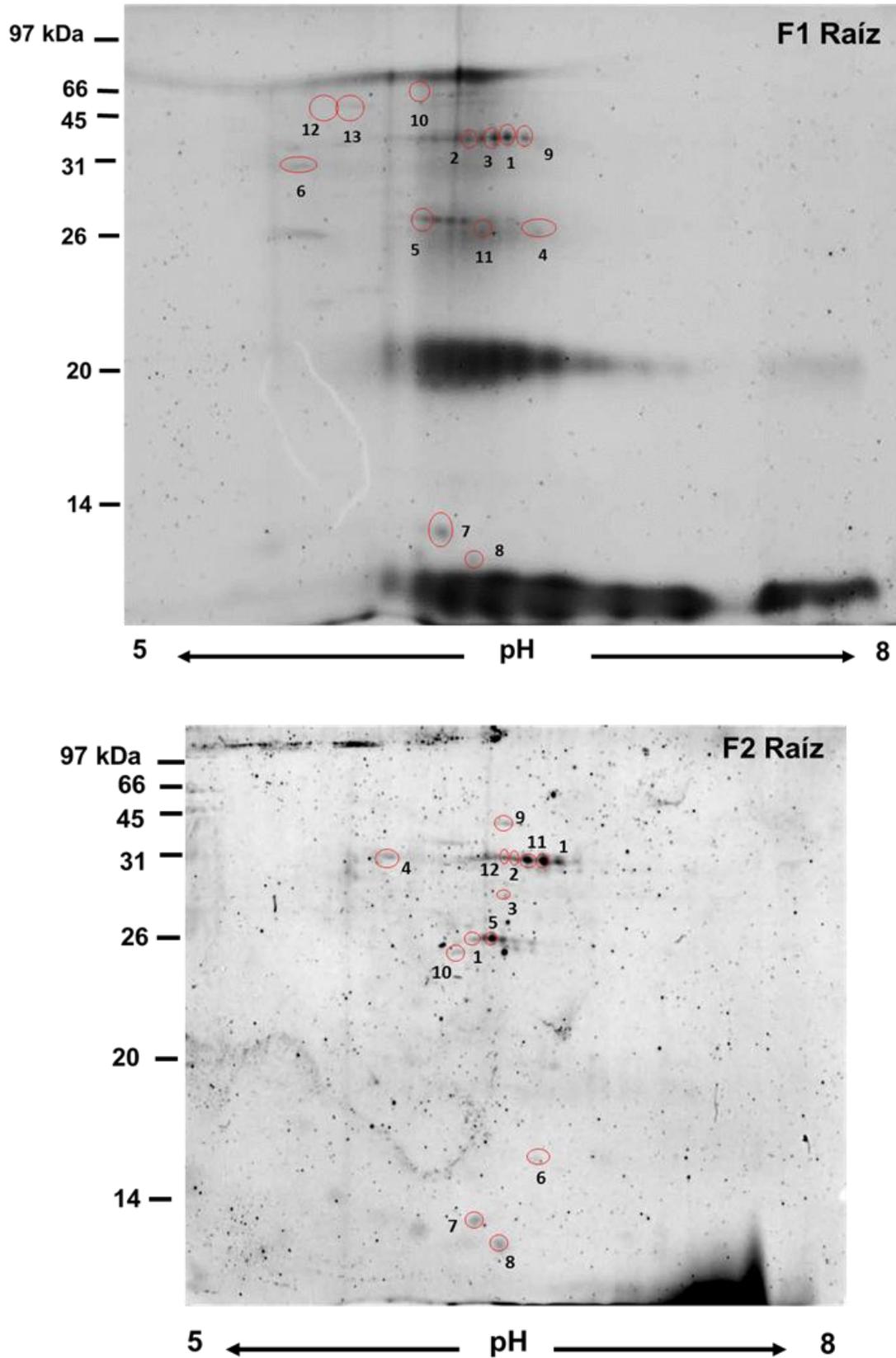


Figura 43.- Geles bidimensionales con las proteínas diana capturadas mediante cromatografía de afinidad a partir de extractos frescos de raíces de plantas de *A. thaliana* de 10 días, usando TRX f1 CS (F1 Raíz) y TRX f2 CS (F2 Raíz).

S	Péptido	PM	pl	N	ID	Gen	Cys
1	Beta-glucosidase 21	60025	6,55	12	Q9C525	At1g66270	7 (1)
2	Beta-glucosidase 22	60142	6,74	12	Q9C8Y9	At1g66280	7 (1)
3	Beta-glucosidase 23	60196	6,45	17	Q9SR37	At3g09260	9 (1)
4	GDSL esterase/lipase	43622	6,65	11	Q1H583	At1g54000	6
5	Glutamate dehydrogenase 2	33417	6,3	12	F4K6P9	At5g07440	4
6	Kinesin like protein (Fragment)	48229	6,19	11	Q0WP75	At4g05190	5
7	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase	79284	5,75	2	Q9ZU46	At2g01210	18
8	Nucleoside diphosphate kinase 1	16547	6,3	6	P39207	At4g09320	1
9	Probable histone-lysine N-methyltransferase ATXR3	269117	6,44	26	O23372	At4g15180	39
10	Putative Athila retroelement ORF1 protein	38012	6,33	9	Q9SJS2	At2g06260	4
11	Putative uncharacterized protein	32653	6,63	8	O81869	At4g19880	5
12	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein	139466	5,75	14	F4JWM0	At5g18370	31
13	Uncharacterized protein	39275	6,21	9	F4K5I5	At5g20450	9

S	Péptido	PM	pl	N	ID	Gen	Cys
1	Beta-glucosidase 21	60025	6,55	5	Q9C525	At1g66270	7 (1)
2	Beta-glucosidase 23	60196	6,45	11	Q9SR37	At3g09260	9 (1)
3	Bifunctional purple acid phosphatase 26	55032	6,8	7	Q949Y3	At5g34850	1
4	DNA primase	59005	8,92	11	F4KHM5	At5g52800	25
5	Glutamate dehydrogenase 2	33417	6,3	13	F4K6P9	At5g07440	4
6	Kinesin like protein (Fragment)	48229	6,19	14	Q0WP75	At4g05190	5
7	Meiotic recombination protein SPO11-2	43669	8,57	9	Q9M4A1	Atg63990	10
8	Nucleoside diphosphate kinase 1	16547	6,3	4	P39207	At4g09320	1
9	Pentatricopeptide repeat-containing protein	93433	8,36	14	O64624	At2g18940	22
10	Protein RKD5	43844	9,2	9	O81791	At4g35590	9
11	Protein transport protein SEC61 subunit beta	10916	11,56	5	Q9FKK1	At5g60460	1
12	Putative uncharacterized protein (Fragment)	63096	7,56	19	A0MFL5	NC	6
13	Uncharacterized protein	36283	8,35	11	Q9FFL0	At5g05640	3

Tablas 11 y 12.- Dianas de TRX *f*1 (arriba) y TRX *f*2 (abajo) identificadas en raíces. S: número de orden de análisis; Péptido: nombre del péptido; PM, peso molecular; pl, punto isoeléctrico; N, número de péptidos; ID, número de identificación en UNIPROT; Cys, nº de cisteínas presentes en la secuencia peptídica (entre paréntesis número de puentes disulfuro descritos).

De las 13 dianas identificadas y seleccionadas en raíces para la TRX *f1* y la TRX *f2*, 5 eran comunes para ambas isoformas de TRXs: la beta-glucosidasa 21 (Q9C525), la beta-glucosidasa 23 (Q9SR37), la nucleósido difosfato kinasa 1 (P39207), la glutamato deshidrogenasa 2 (F4K6P9) y un fragmento de la *kinesin-like protein* (Q0WP75). Entre las dianas, se han encontrado 2 péptidos sin caracterizar, F4K5I5 para la TRX *f1* y Q9FFL0 para el caso de la TRX *f2*, cuyos scores son altos.

Los datos aportados por la aplicación *Classification SuperViewer* reflejaron que las dianas encontradas en raíces pertenecían a 13 categorías de las cuales 12 eran comunes a ambas isoformas.

Las categorías en las que se incluyen las proteínas dianas con frecuencias similares para TRX *f1* y TRX *f2* en raíz fueron las de “respuesta a estímulos bióticos o abióticos”, “respuesta al estrés”, “organización celular y biogénesis”, “otros procesos biológicos”, “transcripción”, “desarrollo”, “otros procesos metabólicos”, “otros procesos celulares”, “metabolismo proteico” y “procesos biológicos desconocidos” (Figura 44A). En la categoría de “metabolismo de ADN/ARN” las dianas halladas para TRX *f2* tuvieron una frecuencia normalizada 4 veces superior a las encontradas para TRX *f1*.

Las potenciales proteínas dianas se clasificaron en 10 funciones moleculares, de las cuales 8 eran comunes para las 2 TRXs (Figura 44B): “actividad hidrolasa”, “unión a nucleótidos”, “otras actividades enzimáticas”, “unión a otros ligandos”, “actividad transferasa”, “unión a proteínas” y “función desconocida”. Las 2 funciones moleculares restantes, “factor de transcripción” y “unión a ADN/ARN” fueron identificadas para la TRX *f2*. Por último, las dianas asociadas a la “actividad kinasa” encontradas para TRX *f1* duplican en frecuencia las correspondientes a TRX *f2*. Las frecuencias determinadas en las demás funciones, fueron similares.

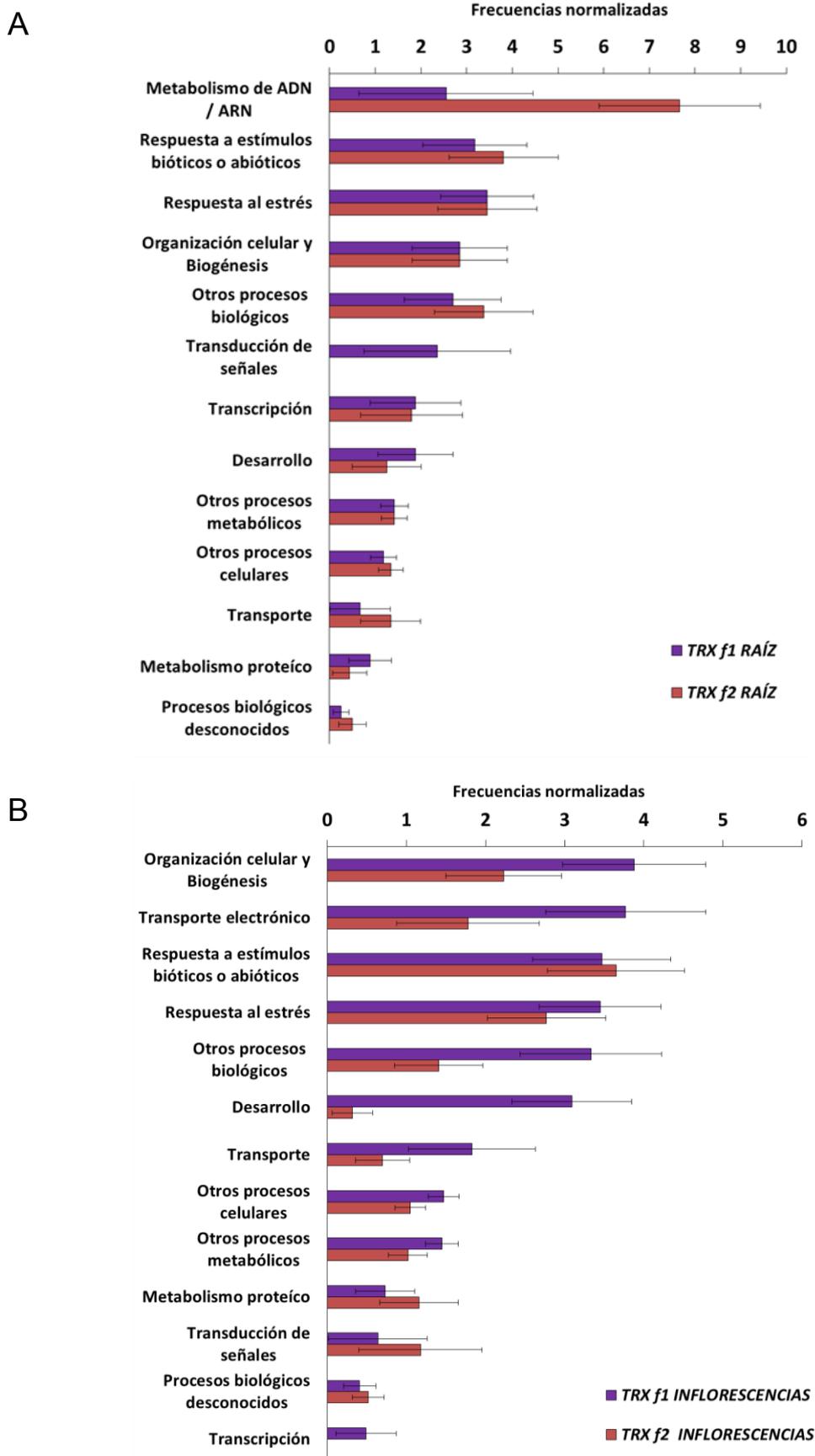


Figura 44.- Categorías (A) y funciones moleculares (B) de las proteínas diana obtenidas para TRX f1 y TRX f2 en raíces de 10 días, comparadas por frecuencia normalizada.

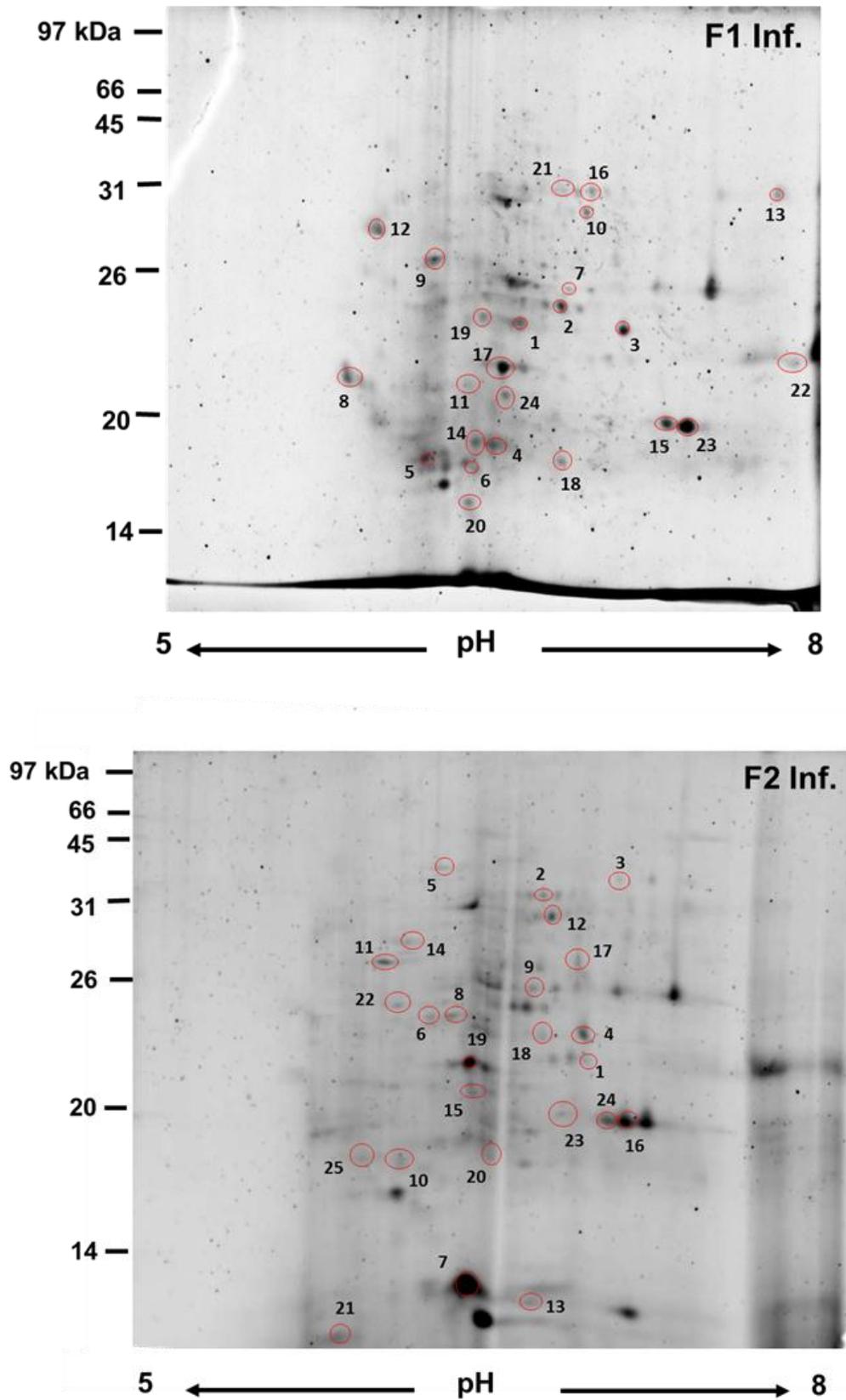


Figura 45.- Geles bidimensionales con las proteínas diana capturadas mediante cromatografía de afinidad a partir de extractos frescos de inflorescencias de plantas de *A. thaliana* de 25 días, usando las formas mutadas y recombinantes TRX f1 CS (F1 Inf.) y TRX f2 CS (F2 Inf.).

S	Péptido	PM	pl	N	ID	Gen	Cys
1	Acyl CoA thioesterase	38487	6,51	7	Q56XD4	At1g01710	6
2	Beta-D-glucopyranosyl abscisate beta-glucosidase*	60877	6,74	12	Q9SE50	At1g52400	8
3	Cysteine proteinase-like protein	38316	7,51	15	Q9LNC1	AT1G06260	10
4	F11O4,12 Putative inorganic phosphatase	24865	6,09	5	O82597	At4g01480	3
5	Ferritin-3, chloroplastic	28876	5,54	10	Q9LYN2	At3g56090	1
6	Ferritin-4, chloroplastic	29068	6,16	8	Q9S756	At2g40300	1
7	Glutamate dehydrogenase	44781	6,38	16	Q1H5A3	At5g18170	5
8	Luminal-binding protein	67644	5,18	6	F4K007	At5g42020	5
9	Myrosinase-binding protein-like	48524	5,12	14	O04309	At3g16470	1
10	NADP-dependent malic enzyme 4, chloroplastic	71458	6,14	22	Q9CA83	At1g79750	5
11	NGATHA2	34363	8,72	10	C3VMM3	At3g61970	2
12	Phosphoinositide phosphatase family protein	94842.8	6,45	12	Q7XZU1	At5g20840	15
13	Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase A6	53894	8,78	9	Q06915	At4g14080	6 (1)
14	Protein disulfide-isomerase A6	29541	5,52	5	F4IL53	At2g47470	6
15	Putative thaumatin	27912	7,61	6	Q8LDH6	At2g28790	16
16	Putative uncharacterized protein	13928	9,48	5	Q8L9H3	NC	2
17	Putative uncharacterized protein	40589	5,55	15	Q56WY3	At1g56070	8
18	Putative uncharacterized protein	26150	6,58	8	Q8W456	At1g20220	2
19	Uncharacterized protein	22984	7,01	4	B9DHT6	At1g07750	3
20	Uncharacterized protein	20567	5,4	6	C0Z397	At5g11200	9
21	Uncharacterized protein	46318	6,85	9	F4J924	At3g31910	4
22	Uncharacterized protein/T23B7,11	36272	8,7	9	Q93ZC1	At3g12148	8
23	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase 1	52058	5,73	9	P57751	At5g17310	3
24	V-type proton ATPase subunit E1	26272	6,04	8	Q39258	At4g11150	4

Tabla 13.- Dianas de TRX *f*1 identificadas en las inflorescencias. S: número de orden de análisis; Péptido: nombre del péptido; PM, peso molecular; pl, punto isoeléctrico; N, número de péptidos; ID, número de identificación en UNIPROT; Cys, nº de cisteínas presentes en la secuencia peptídica (entre paréntesis número de puentes disulfuro descritos).

S	Péptido	PM	pI	N	ID	Gen	Cys
1	Aminoacyl-tRNA synthetase, class II-like domain containing protein	14618	6,28	5	F4HTB1	At1g53705	1
2	Beta-D-glucopyranosyl abscisate beta-glucosidase*	60877	6,74	11	Q9SE50	At1g52400	8 (1)
3	Beta-galactosidase 7	93736	8,47	11	Q9SCV5	At5g20710	19
4	Cysteine proteinase-like protein	38316	7,51	15	Q9LNC1	At1g06260	10
5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	82296	5,11	20	Q8GUM1	At5g25780	1
6	F24B9_13	38515	5,83	7	Q9LQQ3	At1g07750	4
7	F9D16_150	17520	5,89	7	Q9SUQ9	AT4g23680	1
8	Globulin-like protein	38515	5,83	6	Q8LA49	NC	4
9	Glutamate dehydrogenase	44781	6,38	15	Q1H5A3	At5g18170	5
10	IFA-binding protein	32309.6	4.68	8	Q9ZTZ4	NC	1
11	Myrosinase-binding protein-like	48524	5,12	19	O04309	At3g16470	1
12	NADP-dependent malic enzyme 4, chloroplastic	71458	6,14	18	Q9CA83	At1g79750	5
13	Nucleoside diphosphate kinase	25763	9,15	4	B9DHH1	At4g11010	2
14	Probable beta-D-xylosidase 6	88042	5,96	12	Q9LXA8	At5g10560	67
15	Probable carbohydrate esterase	28683	5,63	6	Q8L9J9	At4g34215	6
16	Putative thaumatin	27912	7,61	9	Q8LDH6	At2g28790	16
17	Putative uncharacterized protein	60599	6,42	9	Q56WX9	At1g56070	10
18	Putative uncharacterized protein	128635	5,68	16	Q0WUS2	At4g02480	15
19	Putative uncharacterized protein	40589	5,55	14	Q56WY3	At1g56070	8
20	Putative uncharacterized protein	26150	6,58	5	Q8W456	At1g20220	2
21	Putative uncharacterized protein	28039	4,42	3	O81288	AT4g02450	2
22	T6H22_13	94743	5,89	12	Q9ASR1	At1g56070	16
23	Uncharacterized protein	36079	8,76	12	Q29Q36	At5g20080	2
24	Uncharacterized protein	27912	7,61	9	Q9ZV34	At2g28790	16
25	Uncharacterized protein	12585	10,64	7	F4JG82	At4g03443	3

Tabla 14.- Dianas de TRX f2 identificadas en las inflorescencias. S: número de orden de análisis; Péptido, nombre del péptido; PM, peso molecular; pI, punto isoeléctrico; N, número de péptidos; ID, número de identificación en UNIPROT; Cys, n° de cisteínas presentes en la secuencia peptídica (entre paréntesis número de puentes disulfuro descritos).

En las inflorescencias fueron halladas 24 dianas para la TRX *f1* y 25 dianas para la TRX *f2*. La TRX *f1* y la TRX *f2* comparten 8 péptidos: la proteína de unión a la mirosinasa-*like* (O04309), la traumatina putativa (Q8LDH6), la enzima málica tipo 4 cloroplastídica dependiente de NADP (Q9CA83), la glutamato deshidrogenasa (Q1H5A3), la cisteín proteinasa-*like* (Q9LNC1) y la beta-D-glucopiranosil abscisato beta-glucosidasa (Q9SE50), además de dos proteínas putativas sin caracterizar (Q8W456 y Q56WY3). Entre las péptidos analizados, 5 y 6 péptidos están sin caracterizar en TRX *f1* (Q8L9H3, B9DHT6, C0Z397, F4J924 y Q93ZC1) y TRX *f2* (Q56WX9, Q0WUS2, O81288, Q29Q36, Q9ZV34 y F4JG82) respectivamente.

Según el análisis realizado con *Classification SuperViewer*, las dianas potenciales encontradas en las inflorescencias pertenecen a 13 categorías funcionales de las cuales 12 son comunes a ambas isoformas (Figura 46A). Estas son, “respuesta a estímulos bióticos o abióticos”, “respuesta al estrés”, “otros procesos celulares”, “otros procesos metabólicos”, “metabolismo proteico”, “transducción de señales” y “procesos biológicos desconocidos”. Por otro lado las dianas putativas halladas para la TRX *f1* resultaron tener una frecuencia mayor a las encontradas para TRX *f2* en las categorías de “organización celular y biogénesis”, “transporte electrónico”, “otros procesos biológicos”, “desarrollo” y “transporte”.

Se asignaron 10 funciones moleculares para las dianas seleccionadas con la TRX *f1* y TRX *f2*, de las cuales 8 son compartidas por las isoformas (Figura 46B): “actividad hidrolasa”, “unión a nucleótidos”, “otras actividades enzimáticas”, “unión a otros ligandos”, “otras funciones moleculares”, “unión a ADN/ARN”, “unión a proteínas” y “actividad transferasa”. Las otras 2 funciones moleculares incluían dianas de la TRX *f1* “transporte” y “factor de transcripción”. Por último, las dianas asociadas a funciones de “unión a nucleótidos” encontradas para la TRX *f2* duplicaron en frecuencia las correspondientes a TRX *f1*. Las demás funciones tenían frecuencias similares.

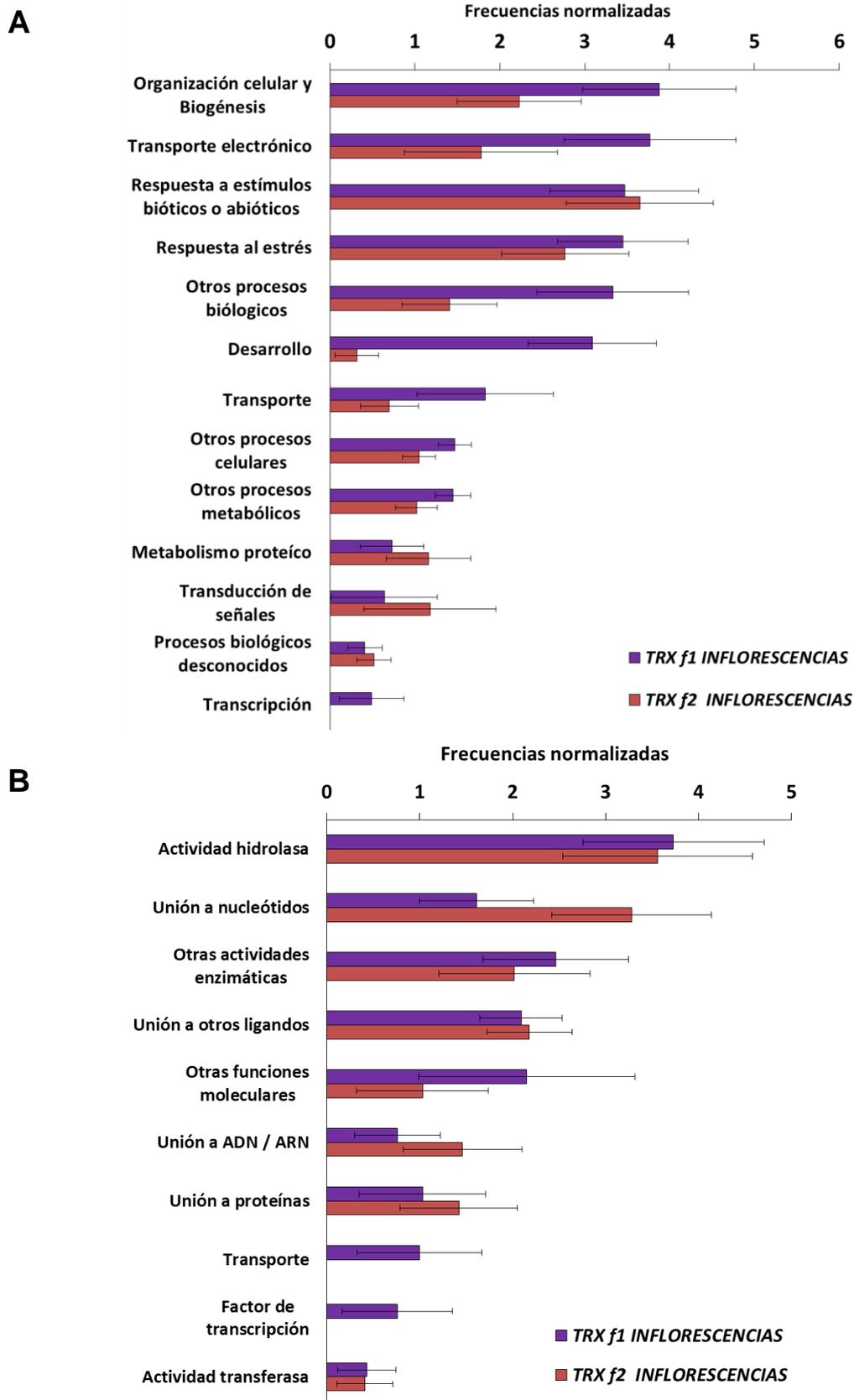


Figura 46.- Categorías (A) y funciones moleculares (B) de las dianas obtenidas para las TRX f1 y TRX f2 en inflorescencias de *Arabidopsis* de 25 días, comparadas por frecuencia normalizada.

## C.- Estudio de líneas defectivas en TRXs *f* y *m* de Arabidopsis.

### C.1.- Aislamiento de mutantes knock out y evaluación de la supresión génica.

#### C.1.1.- Aislamiento de las líneas *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2*.

El aislamiento de las líneas homocigotas se llevó a cabo mediante genotipado por PCR, confirmando la localización de la inserción del T-DNA en la indicada por los laboratorios SALK o GABI-kat de los que provenían las semillas (Figura 47).

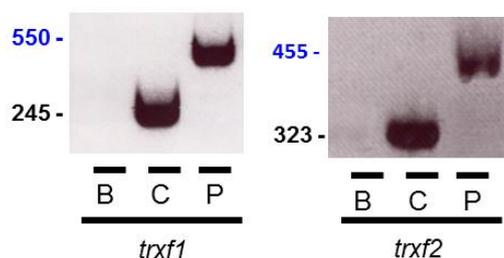


Figura 47.- Reacciones de PCR para verificar el aislamiento de las líneas homocigotas mutantes *trxf1* y *trxf2* usando parejas de oligonucleótidos flanqueantes y específicos; B: Amplificación con pareja de oligonucleótidos, sin ADN; C: Amplificación con la pareja de oligonucleótidos más 1  $\mu$ L de ADN genómico de la línea silvestre Col0; P: Amplificación con la pareja de oligonucleótidos, más 1  $\mu$ L de ADN genómico de la línea mutante. Las condiciones de amplificación fueron 30 ciclos, 25 s de elongación y una  $T_m$  de 55  $^{\circ}$ C para *trxf1*, y de 60  $^{\circ}$ C para *trxf2*.

Las líneas homocigotas fueron identificadas por la presencia de un único amplicón, conteniendo secuencia del gen y del T-DNA, y de mayor tamaño que el del amplicón proveniente del gen silvestre. Estas líneas mutantes afectadas en los genes *TRXF1* y *TRXF2* se denominaron como *trxf1* y *trxf2*, respectivamente.

Para la obtención del doble mutante *trxf1 trxf2*, se procedió al cruzamiento de las líneas mutantes *trxf1* y *trxf2* y al aislamiento tras la segregación de la descendencia del doble heterocigoto.

El análisis mediante RT-PCR semicuantitativa usando oligonucleótidos específicos confirmó la ausencia de de transcritos en los mutantes simples *trxf1* y *trxf2*, indicando que ambas líneas eran líneas de pérdida de función o *knock-out* (utilizando la expresión en inglés) para las respectivas TRXs *f* (Figura 48A).

Así mismo, ensayos de *western-blotting* con anticuerpos anti-PsTRX *f* mostraron un descenso de la señal en los mutantes simples (Figura 48B), que desapareció por completo en la línea *trxf1 trxf2*, confirmando su condición de doble mutante (Figura 48C).

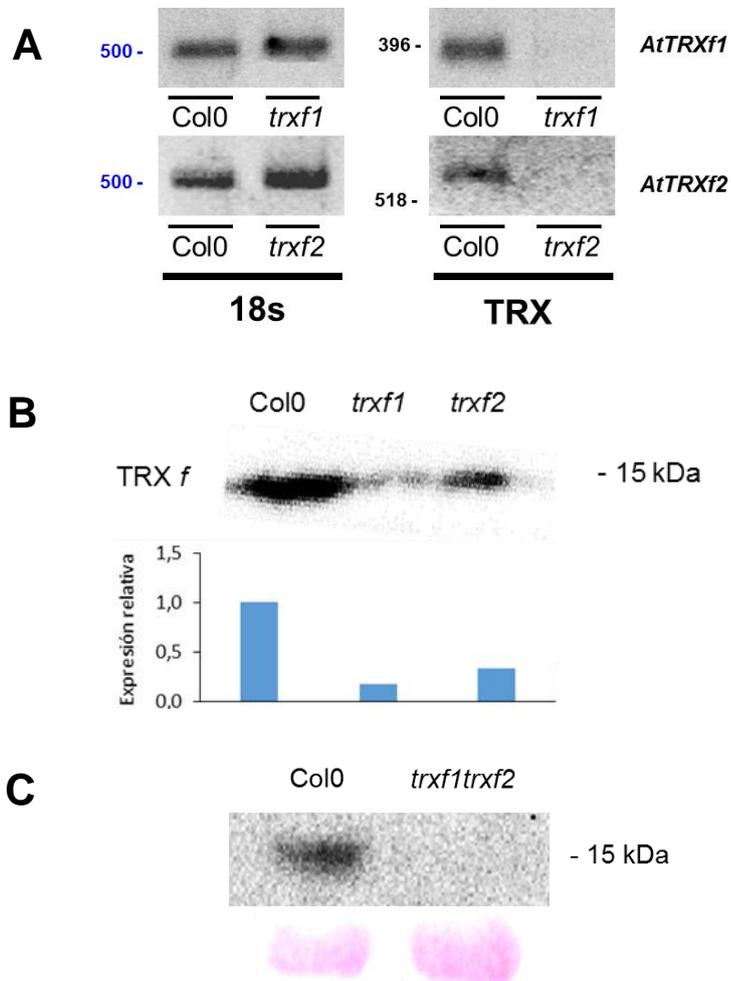


Figura 48.- A) PCR semicuantitativa para aislamiento del doble mutante *trxf1 trxf2*. 18s: oligonucleótidos para amplificar el gen codificante de la subunidad ribosomal 18s; TRX: oligonucleótidos específicos y flanqueantes para la amplificación de los genes *AtTRXf1* y *AtTRXf2*. Las condiciones de amplificación para el gen 18s fueron 28 ciclos para Col0, 25 s de elongación y una *Tm* de 55 °C. Las condiciones de amplificación para los genes codificantes de TRXs en las líneas mutantes fueron: 38 ciclos para *AtTRXf1* y 40 ciclos para *AtTRXf2*; 25 s de elongación en ambos casos y una *Tm* de 50 °C en el caso del gen *AtTRXf1* y de 55 °C en el caso de *AtTRXf2*. B) Reconocimiento inmunológico y cuantificación de la señal obtenida. Se utilizó el anticuerpo TRX *f* de guisante frente a 30 µg de extracto de roseta pertenecientes a la línea control Col0 y los mutantes *trxf1* y *trxf2*. C) *western-blotting* en el que fue utilizado el anticuerpo PsTRX *f*. La proteína soluble se extrajo de rosetas correspondientes a las líneas Col0 y *trxf1 trxf2*, se cuantificó y se analizó utilizando 35 µg. Como control de carga se muestra la banda correspondiente a la subunidad mayor de la RUBISCO teñida con solución de rojo Ponceau.

C.1.1.2.- Aislamiento de líneas *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*.

El aislamiento de los mutantes *trxm* se realizó del mismo modo que para los mutantes *trxf*. Una vez comprobada la localización de un único amplicón, de mayor tamaño, correspondiente a la inserción del T-DNA (Figura 49), se procedió a analizar la acumulación de transcrito en las líneas defectivas *trxm*.

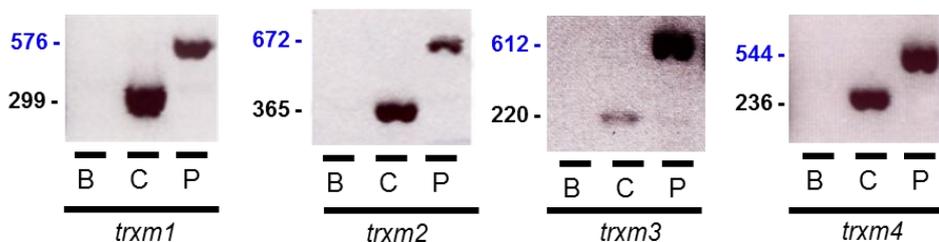


Figura 49.- Reacciones de PCR para verificar el aislamiento de las líneas homocigotas mutantes *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* usando parejas de oligonucleótidos flanqueantes y específicos; B: amplificación con pareja de oligonucleótidos, sin ADN; C: amplificación con la pareja de oligonucleótidos, más 1  $\mu$ L de ADN genómico de línea silvestre Col0 (LE para *trxm3*); P: Amplificación con la pareja de oligonucleótidos, más 1  $\mu$ L de ADN genómico de la línea mutante. Las condiciones de amplificación fueron 30 ciclos, 25 s de elongación y una de  $T_m$  de 55  $^{\circ}$ C para los mutantes *trxm3* y *trxm4*, mientras que para los mutantes *trxm1* y *trxm2* la  $T_m$  fue de 60  $^{\circ}$ C.

Del mismo modo que para las líneas *trxf1* y *trxf2*, los 4 mutantes *trxm* aislados resultaron ser mutantes de pérdida de función para las respectivas TRXs (Figura 50A). Estas líneas mutantes se denominaron como *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*. Como ya se comentó, la línea *trxm3* ya fue denominada con anterioridad como *gat1* (Benitez-alonso et. al, 2012), pero con la intención de facilitar la descripción de los resultados se utilizará el nombre *trxm3* a lo largo de este trabajo.

Con objeto de analizar los cambios provocados en el contenido TRXs *m* en las líneas mutantes individuales (bien sea por la pérdida de una de ellas o por algún fenómeno de compensación del resto de TRXs *m* en respuesta a la mutación) se realizó un análisis de *western-blotting* utilizando el anticuerpo de guisante anti-PsTRX *m* (Figura 50B). El resultado sugiere que, aparentemente, y teniendo en cuenta las limitaciones intrínsecas al anticuerpo utilizado, no parece que exista una respuesta compensatoria a la pérdida de alguna de ellas para que se recupere la señal observada en los silvestres. Para confirmar esta hipótesis, en el siguiente apartado se analizará con detalle la acumulación de los transcritos de las distintas TRXs en los mutantes analizados en este trabajo de Tesis doctoral.

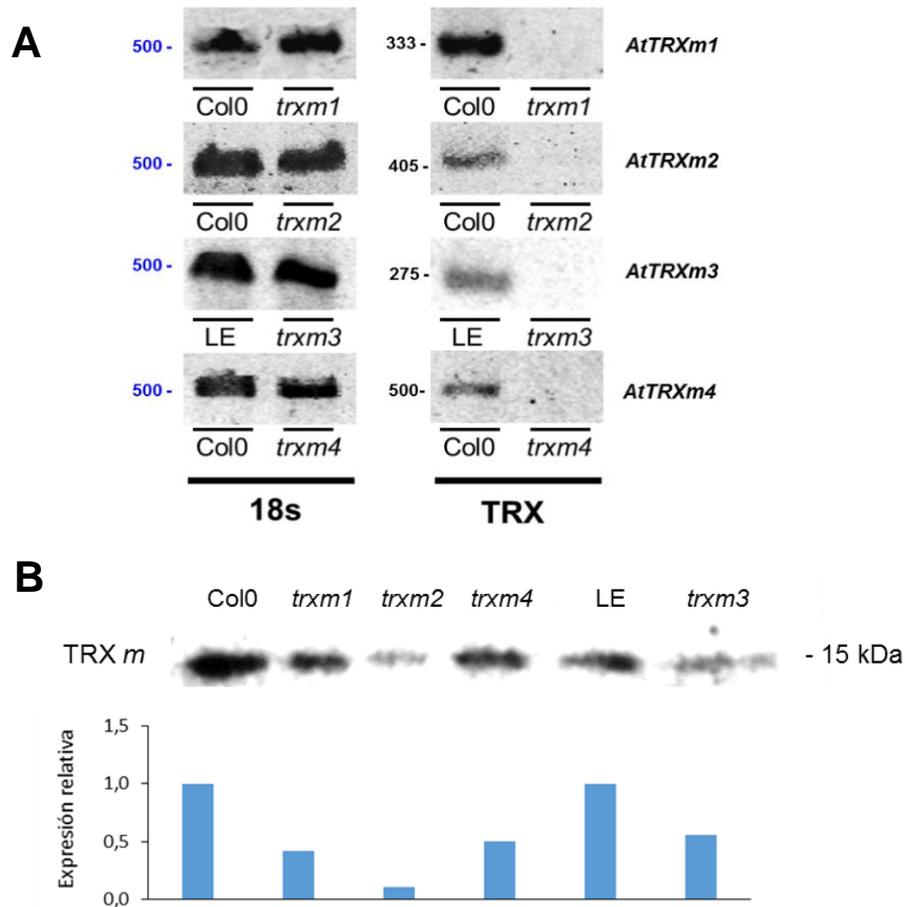
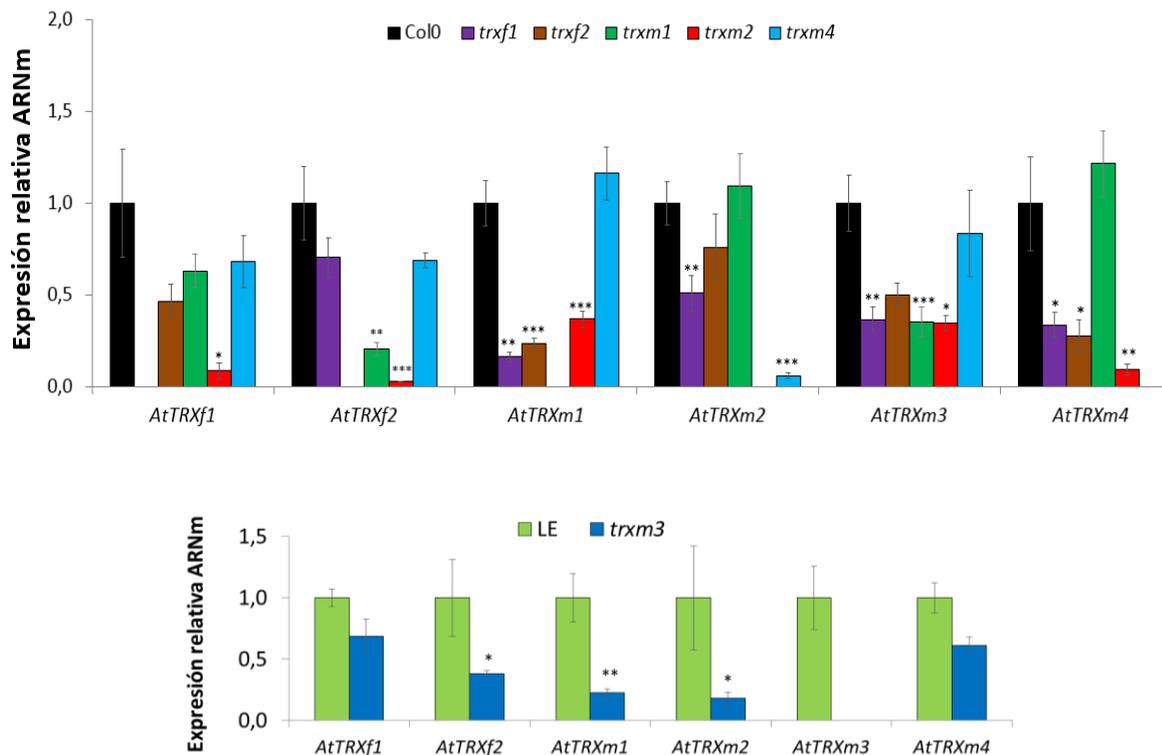


Figura 50.- A) PCR semicuantitativa para aislamiento de mutantes *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*. 18s: oligonucleótidos para amplificar el gen codificante de la subunidad ribosomal 18s (*At18s-F/At18s-R*). TRX: oligonucleótidos específicos para la amplificación de derivados de los genes *AtTRXm1*, *AtTRXm2*, *AtTRXm3* y *AtTRXm4*. Las condiciones de amplificación para el gen 18s fueron 28 ciclos para Col0 y 26 para LE, 25 s de elongación y una Tm de 55 °C; Por último las condiciones de amplificación para los genes codificantes de TRXs en las líneas mutantes fueron: 32 ciclos para *AtTRXm2*, 38 ciclos para *AtTRXm1*, *AtTRXm3* y *AtTRXm4*; 25 s de elongación en todos los casos y una Tm de 50 °C en el caso del gen *AtTRXm1* y de 55 °C en el caso de *AtTRXm2*, *AtTRXm3* y *AtTRXm4*. B) Reconocimiento inmunológico y cuantificación de la señal obtenida. Se utilizaron el anticuerpo TRX m1 de guisante frente a 30 µg de extracto de roseta pertenecientes a las líneas control Col0 y LE y los mutantes *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*.

### C.1.3.- Análisis de expresión de TRXs y NTRC.

Para evaluar el efecto de la pérdida de función de cada uno de los genes codificantes para las TRXs *f* y *m* sobre la expresión de las demás isoformas, así como sobre otras enzimas relacionadas como la NTRC y la TRX *y1*, se realizaron ensayos de RT-qPCR para analizar el contenido de los respectivos ARNm en hojas de roseta de plantas de 25 dpv cultivadas en tierra. Los resultados se muestran en la figura 51, mientras que las variaciones de expresión de los genes en las líneas mutantes, respecto de las líneas control se resumen en la tabla 15.

**A**



**B**

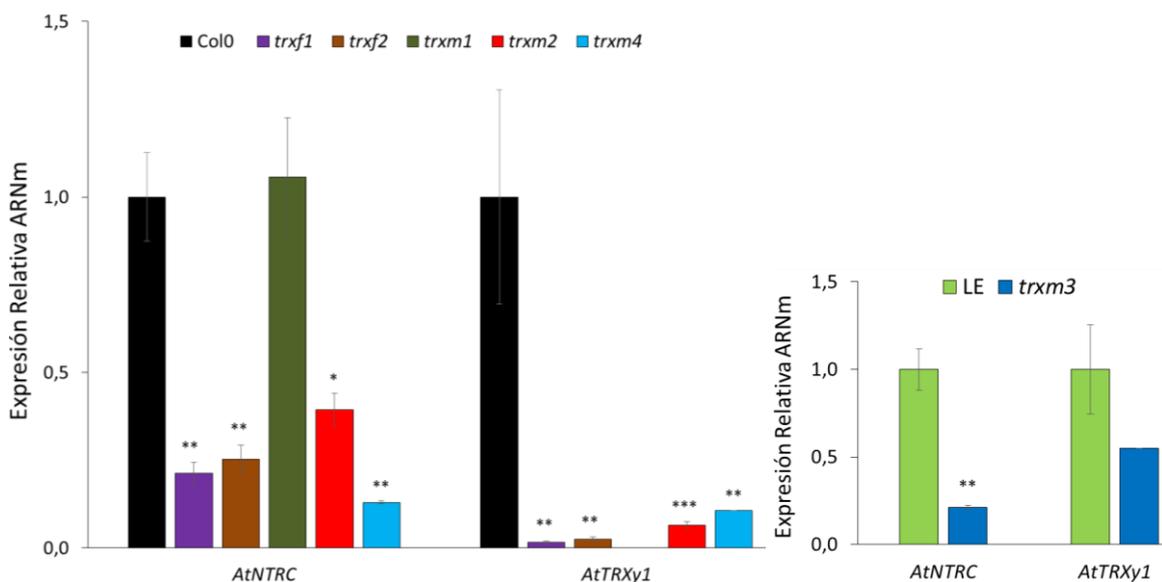


Figura 51.- Expresión de los genes *AtTRX* *f*1, *f*2, *m*1, *m*2, *m*3, *m*4 (A) y de los genes *AtNTRC* y *AtTRXy*1 (B) en la línea silvestre *Col0* (control de expresión) y los mutantes *trxf*1, *trxf*2, *trxm*1, *trxm*2 y *trxm*4; y en línea silvestre *LE* (control de expresión) y el mutante *trxm*3. Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron usando como molde ADNc retrotranscrito de muestras de ARN aislado de hojas de 25 días. Las plantas crecieron bajo condiciones de día largo. Los niveles de transcripción son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes que se normalizaron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para relativizar los niveles de expresión se utilizaron los valores de *AtTRXf*1 (A) y *AtNTRC* (B) en *Col0* y *LE*. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  según *t*-student).

Línea	Gen							
	<i>AtTRXf1</i>	<i>AtTRXf2</i>	<i>AtTrxm1</i>	<i>AtTrxm2</i>	<i>AtTrxm3</i>	<i>AtTrxm4</i>	<i>AtNTRC</i>	<i>AtTRXy1</i>
<i>trxf1</i>	0%	70%	17%**	51%**	37%**	34%*	21%**	2%**
<i>trxf2</i>	47%	0%	24%***	76%	50%	28%*	25%**	3%**
<i>trxm1</i>	63%	21%**	0%	110%	35%***	122%	106%	0%
<i>trxm2</i>	9%*	3%***	37%*	0%	35%*	9%***	39%*	7%***
<i>trxm3</i>	69%	38%*	23%**	18%*	0%	61%**	21%**	55
<i>trxm4</i>	69%	69%	116%	6%***	84%	0%	13%**	11%**

Tabla 15.- Expresión relativa de los genes de los genes *AtTRXf1*, *AtTRXf1*, *AtTRXm1*, *AtTRXm2*, *AtTRXm3*, *AtTRXm4*, *AtNTRC* y *AtTRXy1* en las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* expresadas en % respecto la expresión en las líneas silvestres *Col0* y *LE*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  según t-student).

El mutante *trxf1* presentó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de todos los genes *AtTRXm*; mientras que en la línea *trxf2* se cuantificó un menor contenido de los transcritos correspondientes a los genes *AtTRXm1* y *AtTRXm4*. En el análisis de los mutantes en TRXs del tipo *m*, en la línea *trxm1* se produjo una importante disminución en la acumulación de transcritos de *AtTRXf2* y *AtTRXm3*. La ausencia de TRX *m2* afectó a la expresión de todos los genes de TRXs plastidiales analizados, produciéndose un importante descenso estadísticamente significativo de los ARNm de los mismos, destacando la respuesta de los genes *TRXf1* y *TRXf2* como isoformas más alejadas filogenéticamente de *TRXm2* dentro de las TRXs plastidiales analizadas. El mutante *trxm3* presentó una disminución significativa en los niveles de transcrito de *AtTRXf2*, *AtTRXm1* y *AtTRXm2*. Por último, en el mutante *trxm4* solamente se pudo cuantificar un descenso significativo en el ARNm de *AtTRXm2*. Los niveles de los transcritos de *NTRC* y *TRXy1* mostraron un descenso significativo en casi todas las líneas mutantes, excepto en la línea *trxm1* para *NTRC*. Este descenso fue especialmente llamativo para *TRXy1*.

Estos datos apoyan la hipótesis formulada en el apartado anterior de que la pérdida de función de una de las TRXs *f* o *m*, no disparan mecanismos compensatorios que suplan la ausencia de otra isoforma mediante la inducción de otras isoformas si no que más bien se produciría una regulación negativa del resto de las isoformas, ya sean de un tipo o de otro. Así, los mecanismos de regulación de la homeostasis redox del cloroplasto contarían con elementos de conexión, al menos, entre las isoformas *f* y *m* de las TRXs plastidiales.

## C.2.- Caracterización fisiológica.

### C.2.1.- Porcentaje de germinación.

Los porcentajes de germinación de las líneas *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2* alcanzaron el 100% a partir de los 2 días de crecimiento *in vitro* en condiciones de día largo (Figura 52). Sin embargo, a partir del segundo día, el porcentaje de germinación del mutante *trxm3* fue de solo un 74% en relación al control LE.

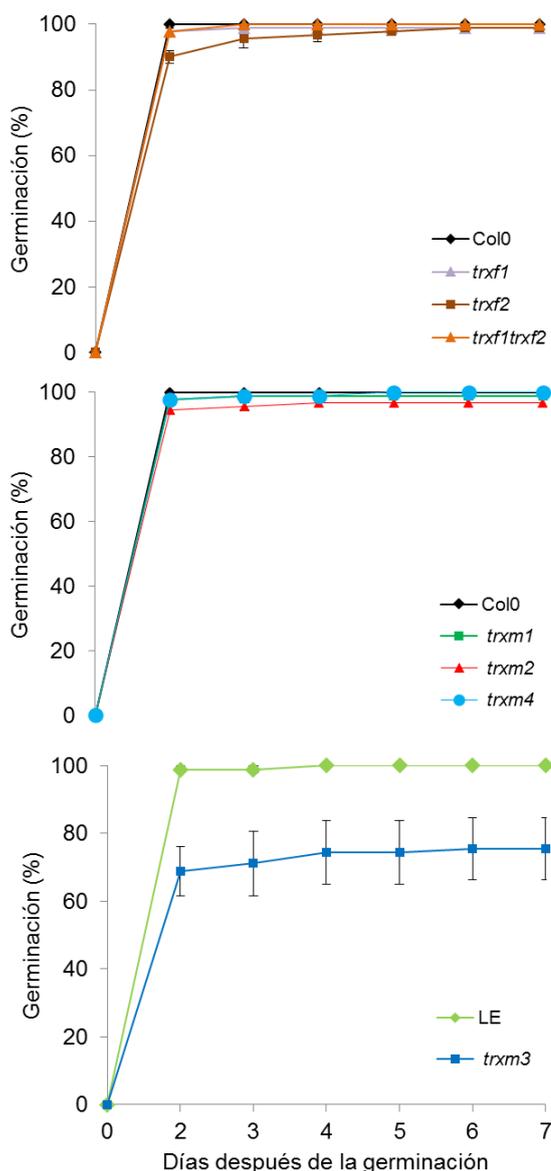


Figura 52.- Curvas de germinación (en %) de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* comparadas con el control *Col0*, y de la línea mutante *trxm3* comparada con el control *LE*, a lo largo de 7 días de incubación *in vitro* bajo condiciones de día largo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

### C.2.2.- Medida del peso fresco y del área foliar por planta.

Después de 30 días de crecimiento, el peso fresco por plántula de los mutantes simples *trxf1*, *trxf2* fue un 24% y un 18% mayor respectivamente, con respecto a la línea silvestre Col0, mientras que el del doble mutante *trxf1 trxf2* era similar al del control (Figura 53).

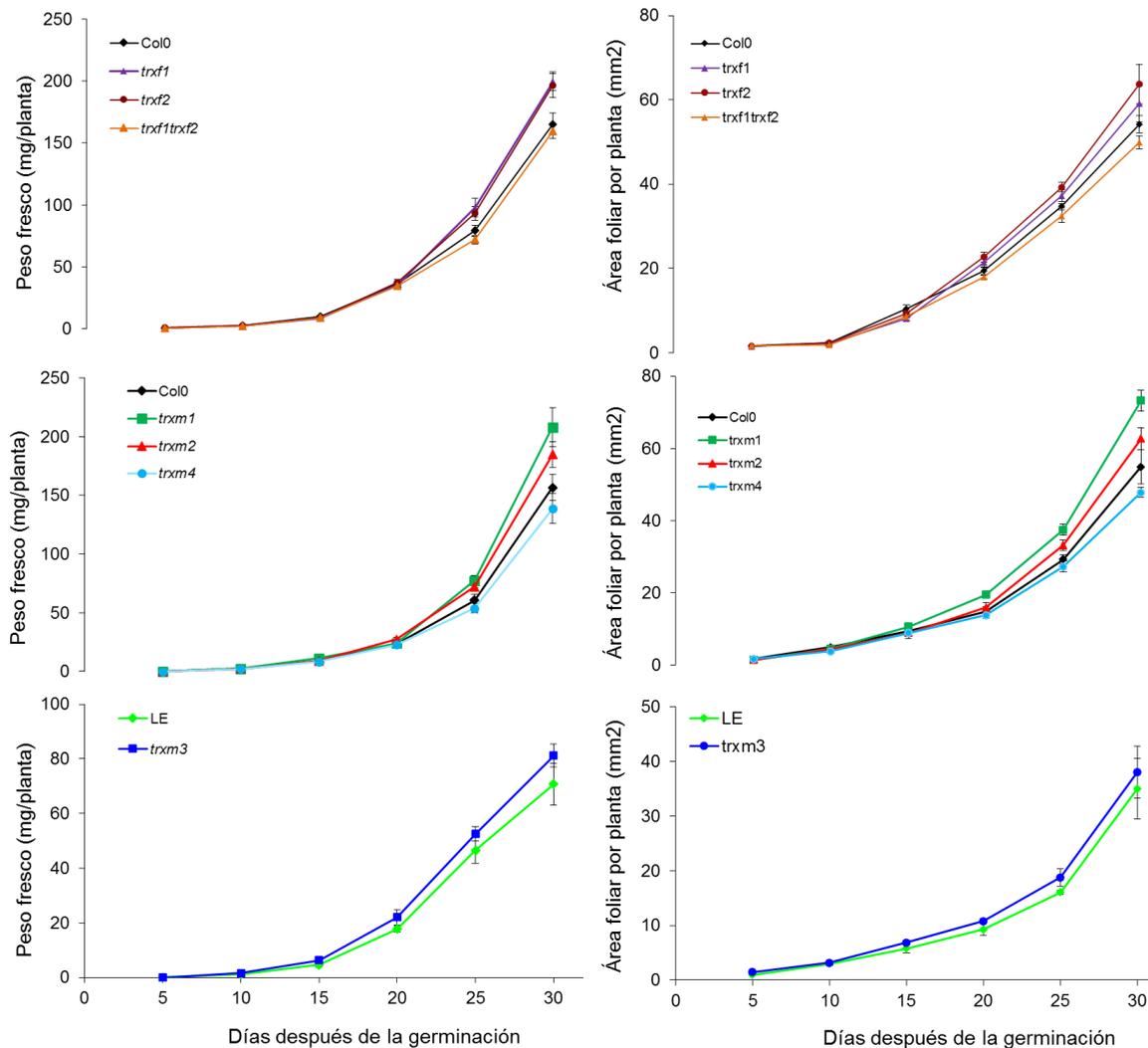


Figura 53.- Curvas de peso fresco (izquierda) y áreas foliares en mm<sup>2</sup> (derecha) de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* comparadas con el control Col0, y de la línea mutante *trxm3* comparada con LE, a lo largo de 30 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Cada punto es la media del peso de 5 plantas y las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

El peso fresco por planta de los mutantes *trxm1* y *trxm2* fue un 28% y un 19% mayor respectivamente que para Col0, mientras que el de *trxm4* resultó un 13% menor. Finalmente, *trxm3* presentó un peso fresco por planta un 13%

superior al de LE tras 30 días de crecimiento. El efecto de las pérdidas de función de las TRXS *f* y *m* sobre el área foliar a lo largo de 30 días de crecimiento fue similar al descrito para el peso fresco por plántula.

En la figura 54 se muestran los fenotipos de las líneas mutantes. Se puede observar un mayor tamaño de la roseta en el caso de los mutantes *trxf1*, *trxf2* y *trxm1* en relación a la línea silvestre Col0. Por el contrario el tamaño de las líneas *trxf1 trxf2* y *trxm4* es menor al control. No se observaron cambios fenotípicos importantes en la línea *trxm3* respecto al control LE.

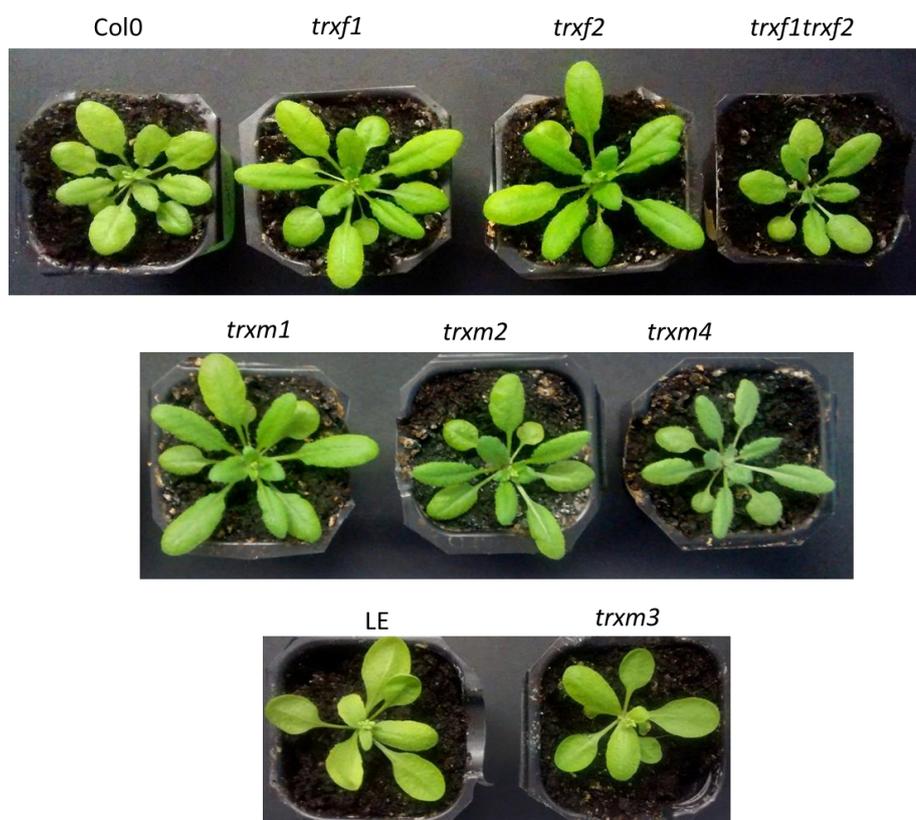


Figura 54.- Fenotipos de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* comparadas con la línea silvestre Col0, y de la línea mutante *trxm3* comparada con la línea silvestre LE, a los 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo.

### C.2.3.- Cuantificación del número de hojas de roseta.

El número de hojas de roseta medido a lo largo del desarrollo vegetal de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4* no difirió significativamente del mostrado por la línea silvestre Col0 (Figura 55). Igualmente no se encontraron diferencias para este parámetro fisiológico entre el mutante *trxm3* y la línea LE.

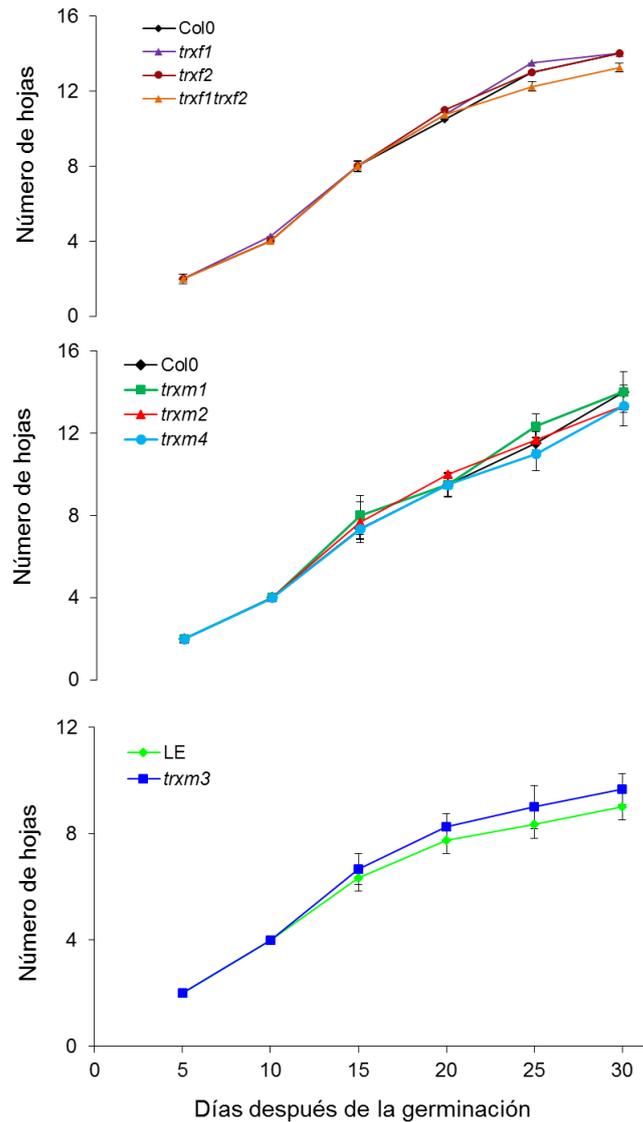


Figura 55.- Número de hojas por roseta de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* en relación con la línea silvestre *Col0*, y de la línea mutante *trxm3* comparado con la línea silvestre *LE*, a lo largo de 30 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Cada punto es la media del número de hojas de 5 plantas y las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

#### C.2.4.- Curvas de crecimiento de la raíz primaria.

A los 11 días las curvas de crecimiento de la raíz primaria de los mutantes *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2* presentaron una longitud un 7, 12 y 14% menor respectivamente que la de *Col0* (Figura 56). La longitud de las raíces de los mutantes *trxm1* y *trxm2* fueron un 3 y 6% mayor respectivamente que la de *Col0*, mientras que la del mutante *trxm4* resultó ser un 10% menor. Por último, el crecimiento de *trxm3* resultó un 13% menor que la de la línea silvestre *LE*.

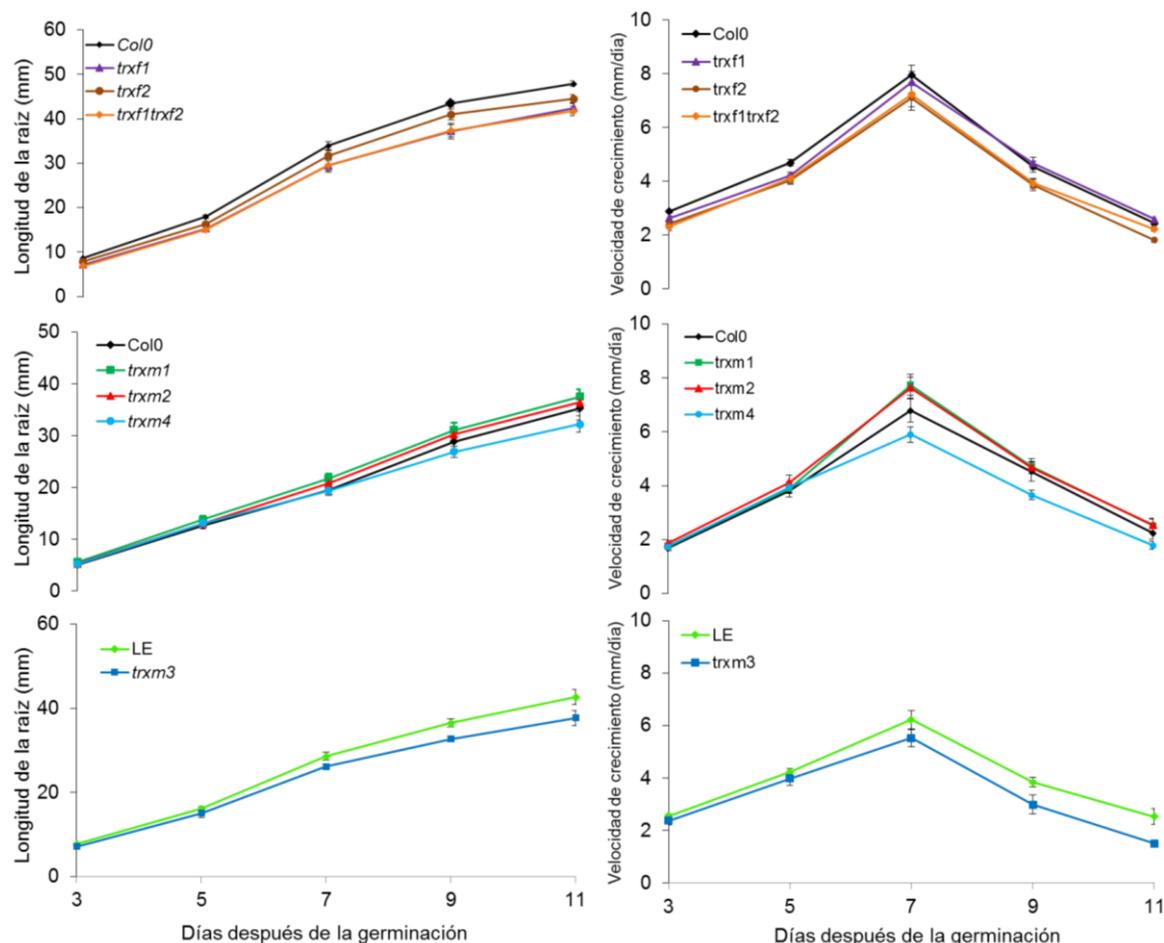


Figura 56.- Curvas de crecimiento (izquierda) y de velocidad de crecimiento (derecha) de la raíz primaria de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* en comparación con el silvestre *Col0*, y de la línea mutante *trxm3* comparada con el silvestre *LE*, a lo largo de 11 días de crecimiento *in vitro* en placas verticales bajo condiciones de día largo. Cada punto es la media de las medidas de 6 plantas distintas y las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

Para establecer diferencias entre las curvas de velocidad de crecimiento de las líneas mutantes y control, se tuvieron en cuenta las variaciones en la velocidad máxima de crecimiento, que en todos los casos se registro a los 7 días después del inicio de la germinación.

El mutante *trxf1* presentó una medida un 3% menor que la de *Col0*, mientras que para *trxf2* y *trxf1 trxf2*, este valor resultó un 17 y un 13% inferior respectivamente (Figura 56). En el caso de las líneas *trxm1* y *trxm2* este parámetro fue un 7 y un 8% superior respectivamente que el mostrado por *Col0*. El mutante *trxm4* presentó un valor un 12% menor. Por último, la medida correspondiente a *trxm3* fue un 18% inferior que la de *LE*.

### C.2.5.- Estudio de la estructura interna de hojas de roseta.

Las estructuras observadas a través de un microscopio SEM de los estomas de las hojas de los mutantes se muestran en la (Figura 57). El tamaño de los estomas de la *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* parecen ligeramente menor en relación a los estomas de Col0. La estructura de los estomas de *trxf1* y *trxf2* es muy similar a los estomas de la planta silvestre. No se encontraron diferencias en la morfología de los estomas del mutante *trxm3* con respecto a la línea LE.

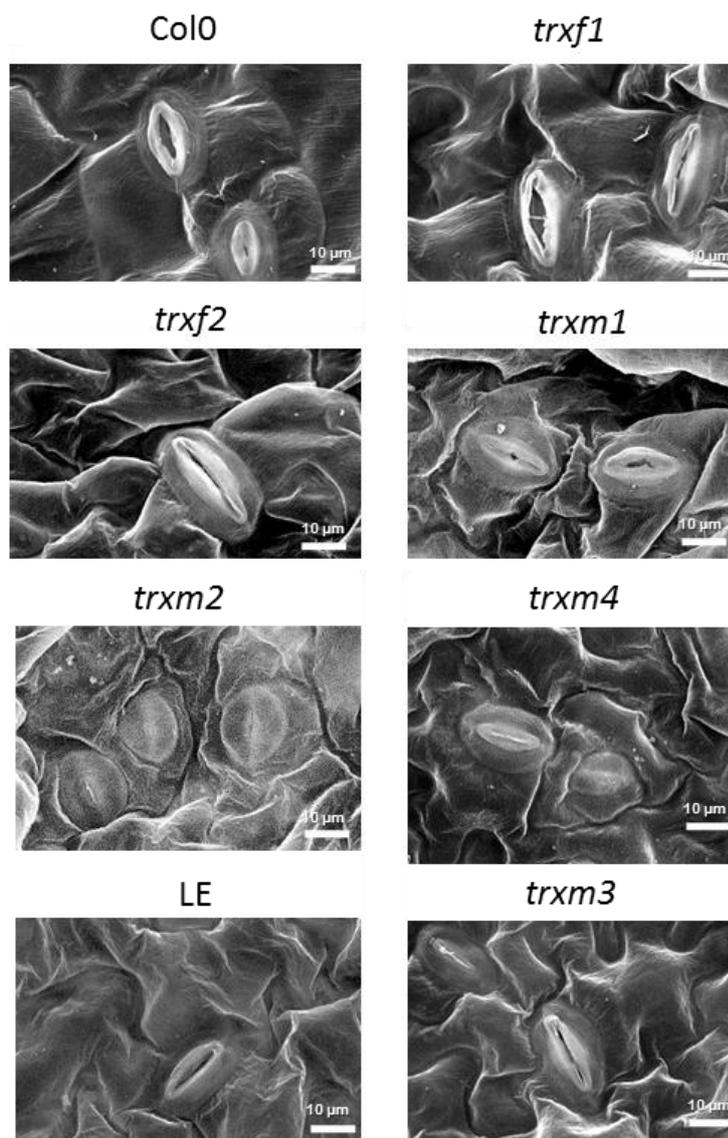


Figura 57.- Micrográficas obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) que ilustran las diferencias morfológicas entre estomas de la cara abaxial de hojas de roseta de 25 días crecidas bajo condiciones de día largo, pertenecientes a la línea control Col0 y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, y a la línea control LE y el mutante *trxm3*. Escala de las barras = 10 µm.

C.2.6.- Estudio del mesófilo de hojas de roseta, de la morfología de los cloroplastos y de su contenido en almidón.

En las figura 58 se observa que las estructuras celulares, epidermis, mesófilo, xilema y floema y estomas de las líneas mutantes son similares a las del control, con excepción de la línea mutante *trxf1*, en las que se detecta que las células del mesófilo son más grandes.

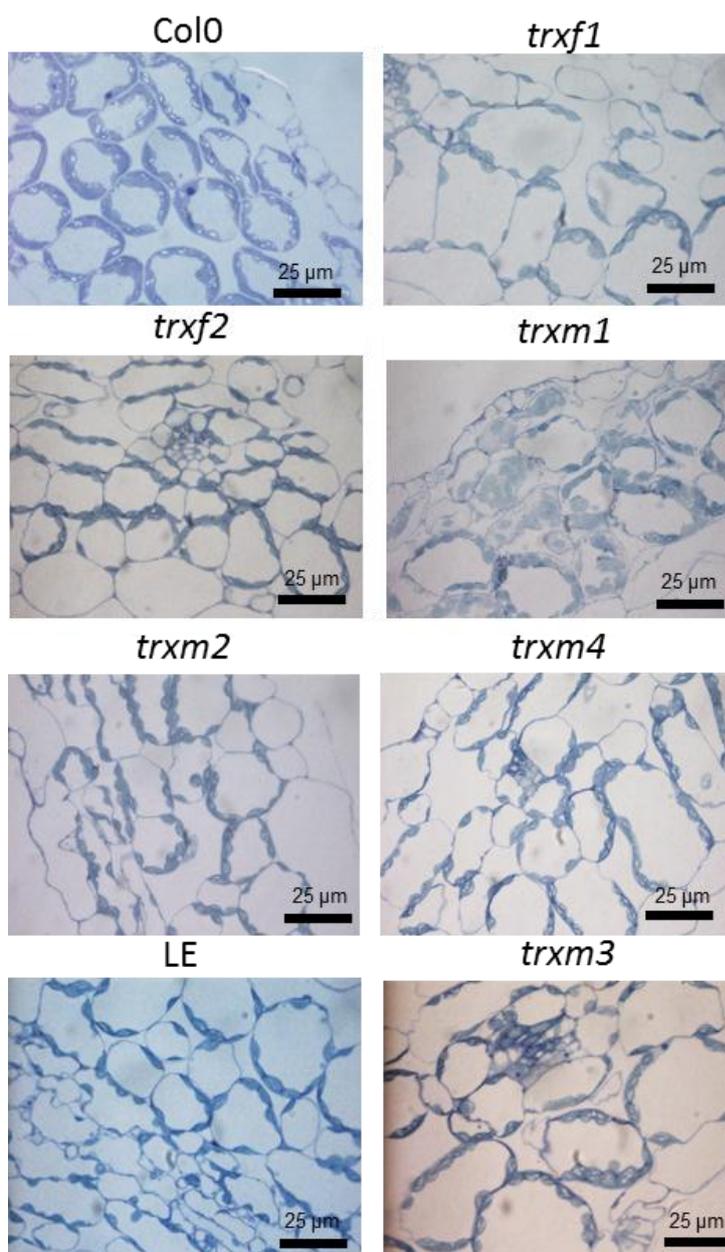


Figura 58.- Imágenes de microscopía óptica de secciones de hojas de roseta pertenecientes a la línea control Col0 y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, y a la línea control LE y el mutante *trxm3*. Las plantas crecieron durante 25 días bajo condiciones de día largo. Las cortes semi-finos correspondientes a cada línea fueron previamente teñidos con azul de toluidina. Escala de las barras = 25 µm

La mayor diferencia radica en el número de cloroplastos por célula. Los cortes semi-finos de hojas de los mutantes teñidas con azul de toluidina y observados al microscopio óptico muestran, comparadas con el control Col0, una disminución del número de cloroplastos en el caso de las líneas *trxf1*, *trxf2*, *trxm2* y *trxm4* (Figura 59).

El mutante *trxm3* mostró mayor número de cloroplastos por célula en relación a su control LE.

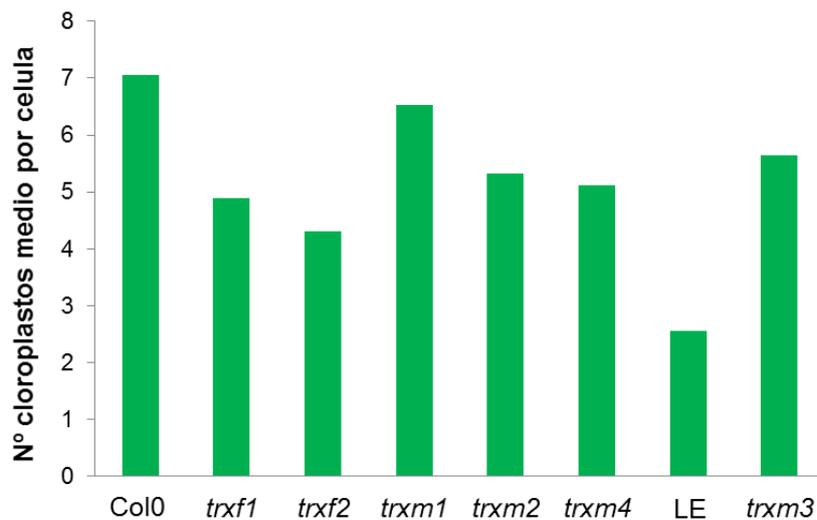


Figura 59.- Número de cloroplastos promedio por célula, medido para las líneas control Col0 y LE y las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*.

Las observaciones al microscopio electrónico (Figura 60) indican que las estructuras celulares en el interior del cloroplasto no parecen afectadas. Se puede comprobar la homogeneidad de tilacoides, lamelas y granas, no existiendo una disrupción de las estructuras fotosintéticas.

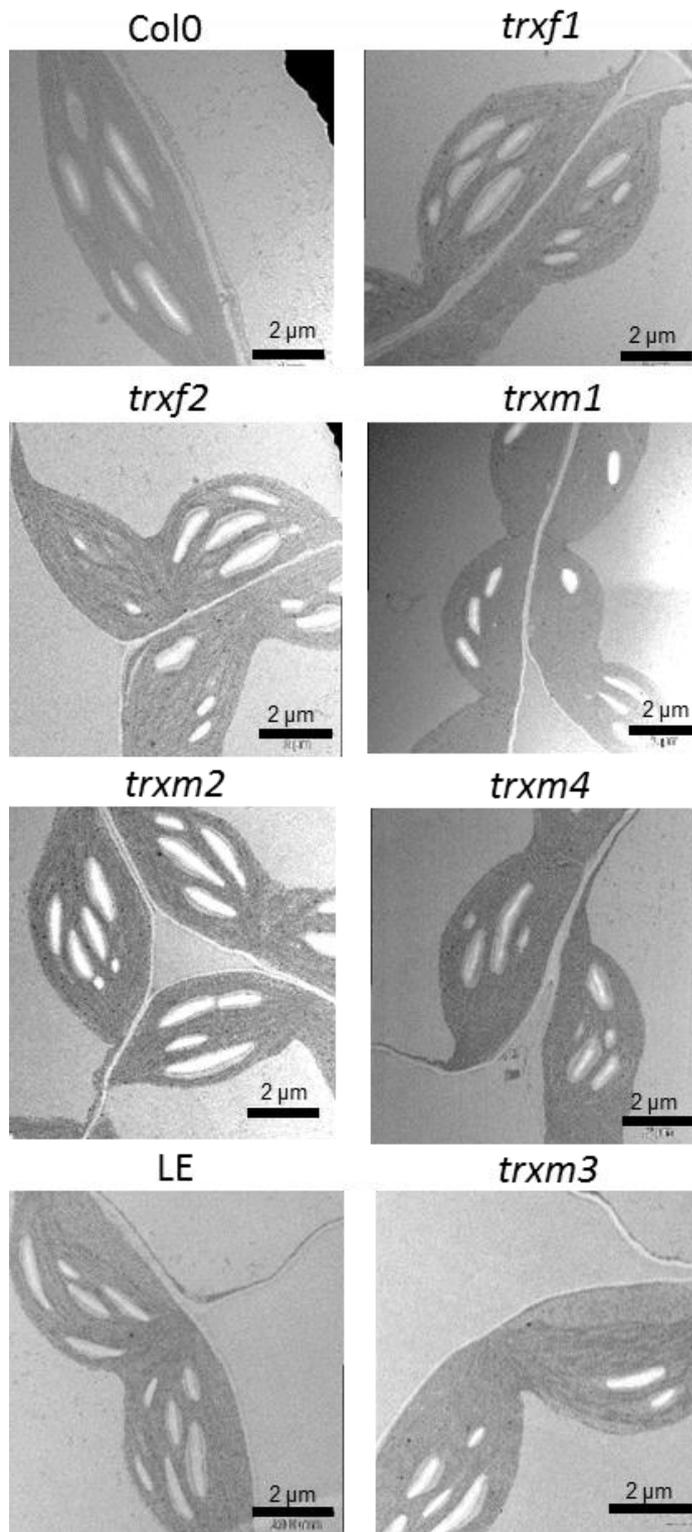


Figura 60.- Imágenes de microscopía electrónica de secciones de hojas de roseta pertenecientes a la línea control Col0 y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, y a la línea control LE y el mutante *trxm3*. Las plantas crecieron durante 25 días bajo condiciones de día largo. Pueden diferenciarse los cloroplastos y, en el interior de ellos, se pueden observar los gránulos de almidón como estructuras blancas menos electrodensas que el estroma. Escala de las barras = 2 µm.

El número de granos de almidón medio por cloroplastos no varía en las líneas mutantes en relación al encontrado en las líneas silvestres (Figura 61).

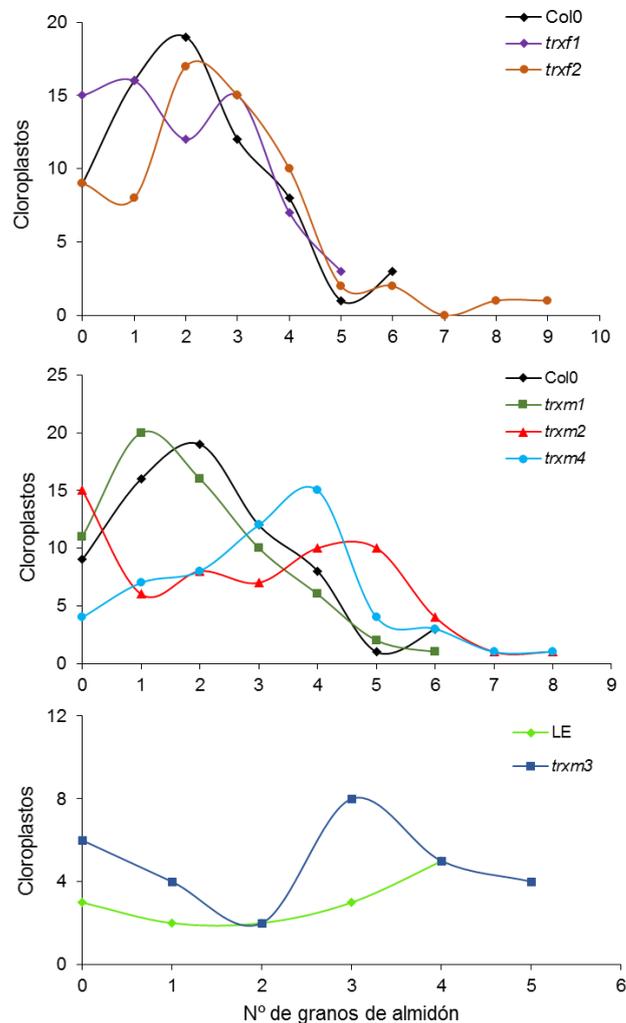


Figura 61- Distribución de gránulos de almidón observados por cloroplasto, en base a las imágenes obtenidas, mediante microscopía electrónica, de secciones de hojas pertenecientes a la línea control Col0 y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, y a la línea control LE y el mutante *trxm3*.

### C.2.7.- Estudio de la estructura interna de la raíz primaria.

Por medio de la tinción con toluidina de cortes transversales de zona de elongación de las raíces de las líneas control y mutantes, se observó que no existen diferencias en la morfología las capas de células correspondientes a los haces vasculares del xilema y floema (Figura 62), a excepción del mutante *trxf1*, que presenta una concentración celular en cilindros más densa y unos haces más reducidos

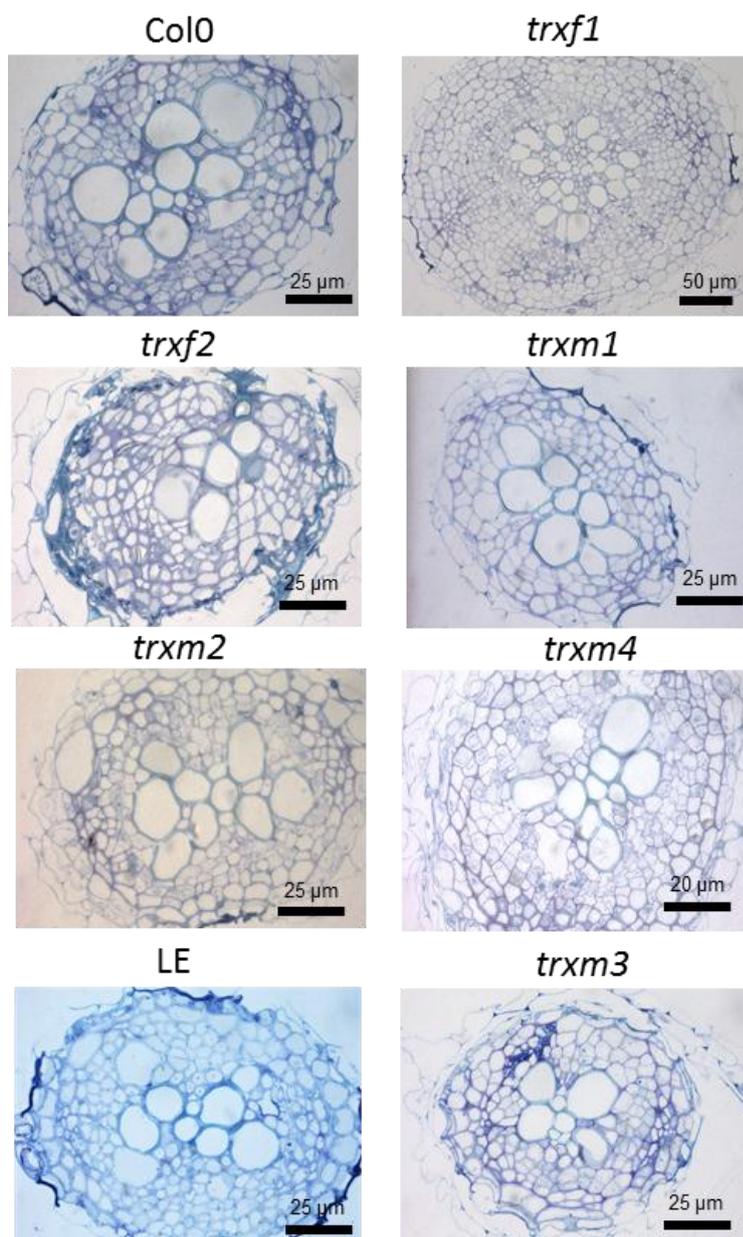


Figura 62.- Imágenes de microscopía óptica correspondientes a cilindros vasculares de la zona de elongación de raíces, pertenecientes a la línea control Col0 y los mutantes *trx1*, *trx2*, *trx1*, *trx2*, *trx4*, y a la línea control LE y el mutante *trx3*. Las plantas crecieron durante 12 días bajo condiciones de día largo. Las cortes semi-finos correspondientes a cada línea fueron previamente teñidos con azul de toluidina. Escala de las barras: *trx4* = 20  $\mu\text{m}$ ; Col0, *trx2* *trx1*, *trx2*, LE y *trx3* = 25  $\mu\text{m}$ ; *trx1* = 50  $\mu\text{m}$ .

Las tinciones con yoduro de propidio permitieron la observación de la región apical de las raíces por microscopía confocal (Figura 63). No fueron distinguibles diferencias importantes entre las líneas mutantes y las líneas control, tanto a nivel de la zona de elongación, como a nivel de la zona meristemática (células de xilema, floema y periciclo) y la cofia. En este último segmento se pudieron apreciar los gránulos de almidón presentes, igualmente sin diferencias significativas.

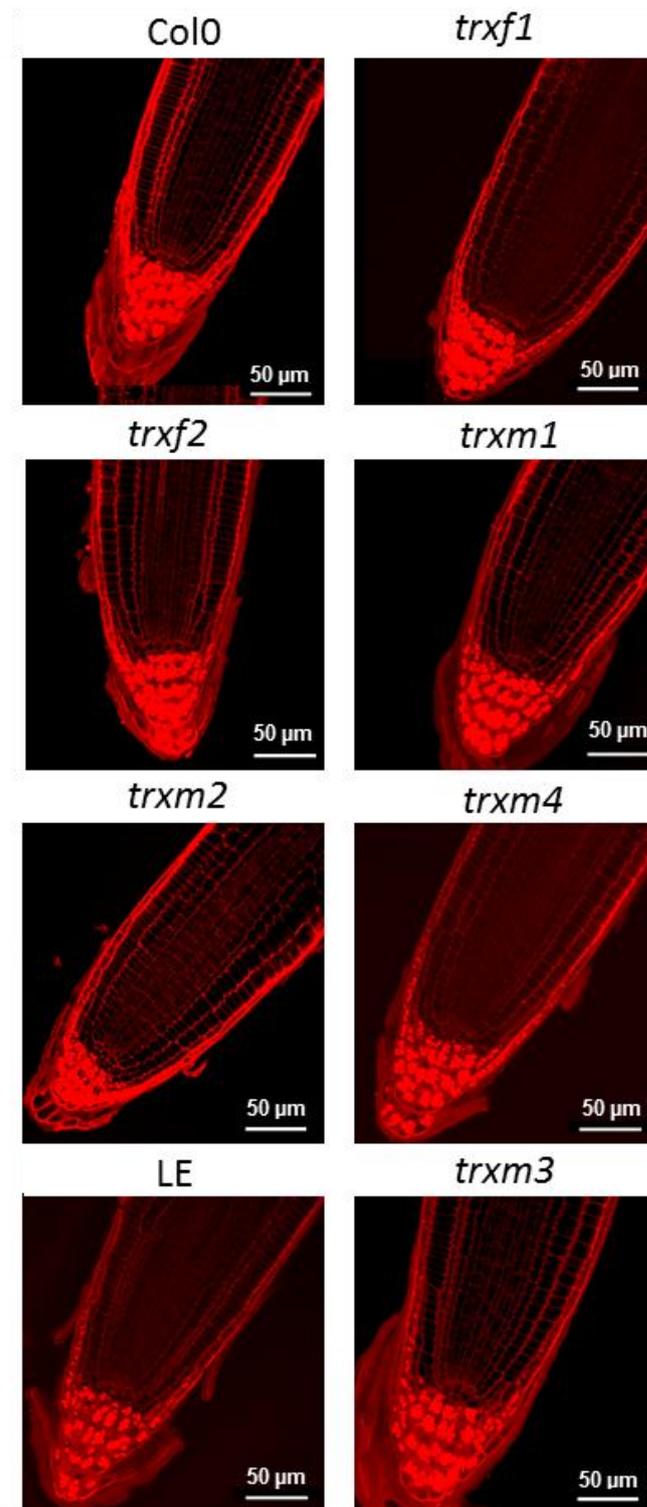


Figura 63.- Imágenes de microscopía confocal correspondientes a raíces pertenecientes a la línea control Col0 y los mutantes trxf1, trxf2, trxm1, trxm2, trxm4, y a la línea control LE y el mutante trxm3. Las plantas crecieron durante 12 días bajo condiciones de día largo. Previa observación las raíces analizadas fueron tratadas con yoduro de propidio. Escala de las barras = 50 μm.

C.2.8.- Determinación de clorofilas.

Los niveles de las clorofilas a, b y el ratio Chl a/b de los mutantes y de las líneas control fueron medidos en hojas de roseta que crecieron en condiciones de día largo durante 25 días. En la figura XX se observa que solo el contenido de clorofila en el mutante *trxm4* varía significativamente en relación a Col0, siendo un 22% menor (Figura 64). Esta diferencia también se reflejó en una disminución del contenido total de clorofilas. El ratio Chl a/b de todas las líneas mutantes fue inferior entre el 12 y 19% en relación al de las líneas control Col0 y LE.

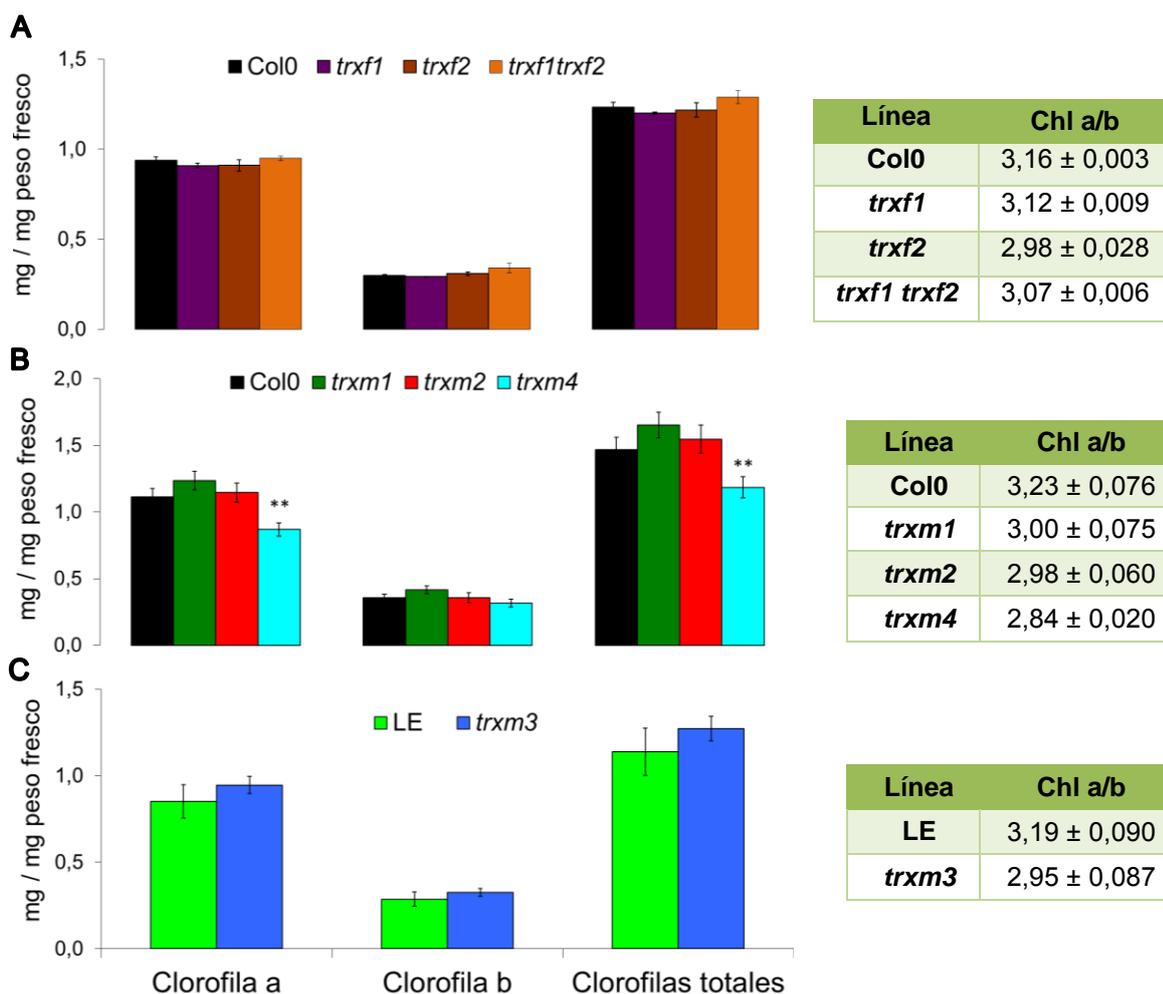


Figura 64.- Contenido en clorofilas a, b y totales (izquierda) y ratio clorofila a / clorofila b (derecha) de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2* (A) y *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* (B) comparados con la línea control Col0, y de la línea mutante *trxm3* (C) comparada con LE. Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 6 individuos por línea. Se indican las diferencias significativas respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,01$  según *t*-student).

### C.2.9.- Determinación de carotenoides y antocianinas.

La determinación del contenido en carotenoides en hojas de roseta de 25 dpv de las diferentes líneas mutantes no mostró diferencias salvo en el caso de la línea *trxm4*, que presentó un contenido un 25% significativamente menor al determinado para la línea control Col0 (Figura 65).

La determinación de los niveles de antocianinas en hojas de roseta de 25 dpv de desarrollo indicó que no existen diferencias significativas entre las líneas mutantes estudiadas y las líneas control.

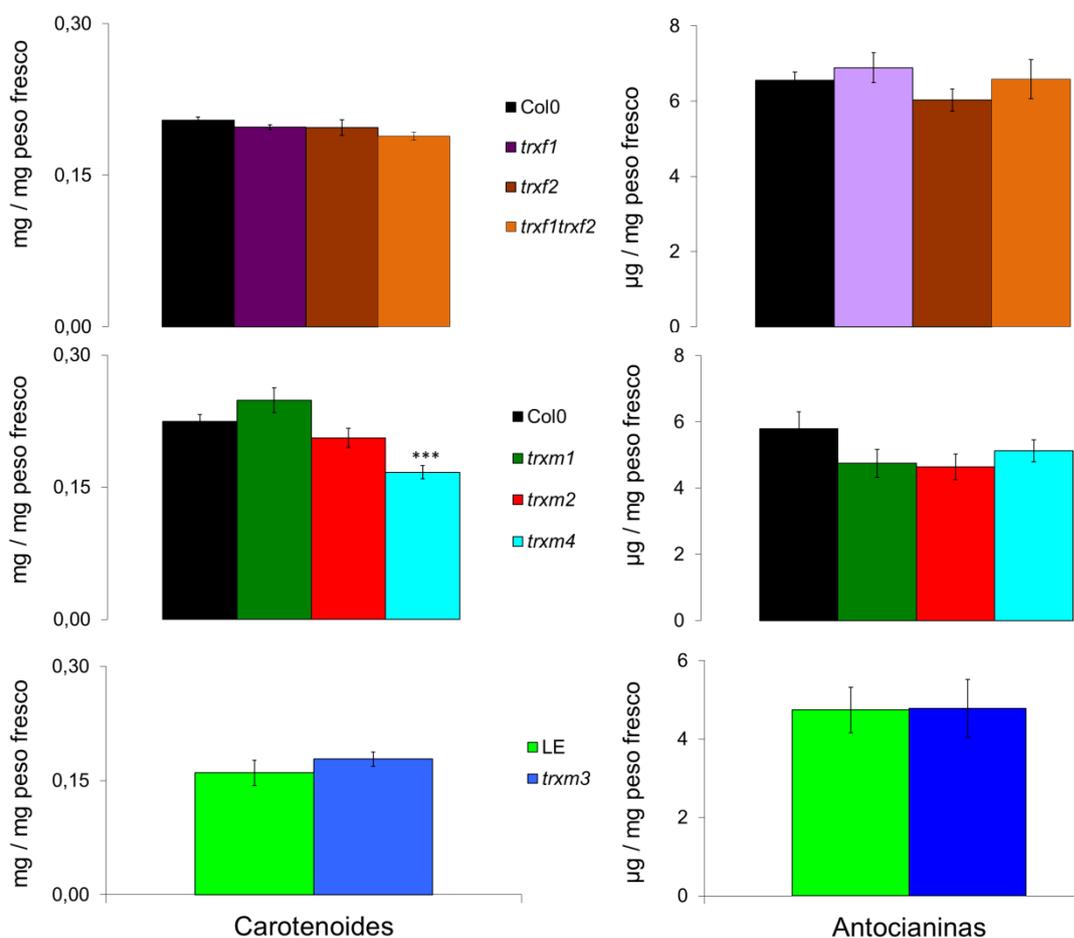


Figura 65.- Contenidos en carotenoides (izquierda) y antocianinas (derecha) cuantificados en las líneas mutantes *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* comparados con la línea control Col0, y en la línea mutante *trxm3* comparada con LE. Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 6 individuos por línea. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\*\*)  $p < 0,001$  según *t*-student).

### C.3.- Caracterización del proceso fotosintético.

#### C.3.1.- Curvas de fotosíntesis en respuesta a distintas intensidades de luz.

La tasa fotosintética se midió mediante un sistema IRGA abierto en hojas de cada una de las líneas tras su crecimiento en condiciones controladas de luminosidad ( $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) y  $\text{CO}_2$ .

Las curvas de respuesta a luz ( $A/Q$ ) mostraron que la planta silvestre alcanza un máximo de asimilación de  $\text{CO}_2$  a  $2000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Se puede observar que existe una menor tasa fotosintética de *trxf1* y mayor para *trxf2* y el doble mutante en relación a Col0, aunque las diferencias no son significativas (Figura 66).

La transpiración ( $E$ ) y la conductancia ( $g_s$ ) crecen de forma paralela al incremento de la intensidad de la luz. *trxf1* presenta una  $E$  y  $g_s$  ligeramente superiores a los que se obtienen para Col0 y las otras dos líneas mutantes.

La tasa fotosintética, transpiración y conductancia de *trxm1*, *trxm2*, *trxm4* fue ligeramente inferior a la obtenida para el control Col0, aunque las diferencias no fueron significativas.

Estas incrementaron con el aumento de la intensidad lumínica. El caso del mutante *trxm3* es más claro, ya que la  $A$ ,  $E$  y  $g_s$  es un 25% menor en relación al control LE.

La tasa fotosintética, la transpiración y la conductancia disminuyeron de forma muy significativa a lo largo de la curva de luz en relación al control LE (Figura 67).

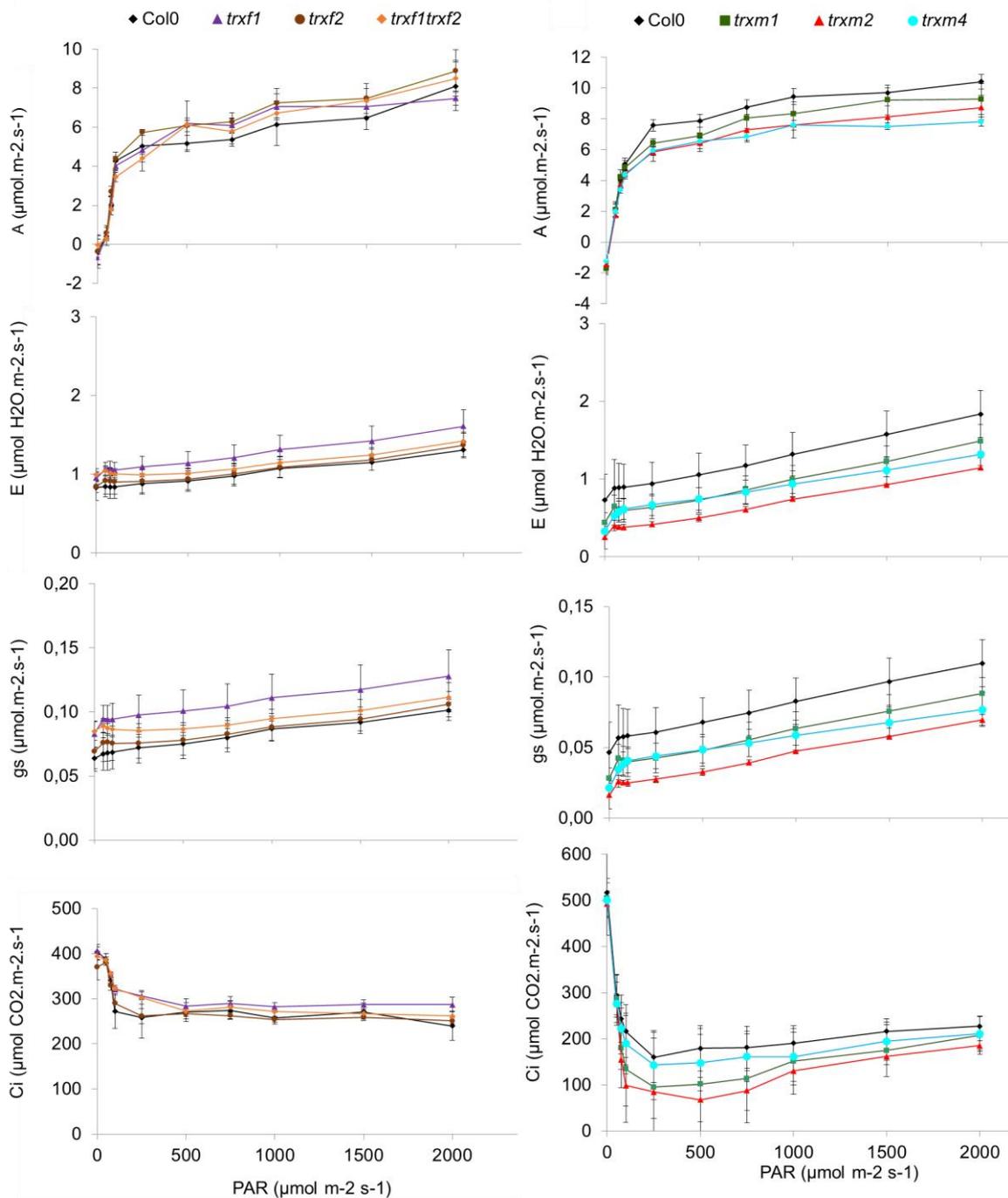


Figura 66.- Curvas de respuesta a luz de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* en comparación con la línea silvestre Col0. Fueron obtenidas en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo: A, tasa de fijación de CO<sub>2</sub> o fotosíntesis neta; E, tasa de transpiración; g, conductancia estomática y C<sub>i</sub>, concentración de CO<sub>2</sub> subestomática. Cada curva consta de 8 puntos obtenidos como la media de 5 medidas independientes para cada línea. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

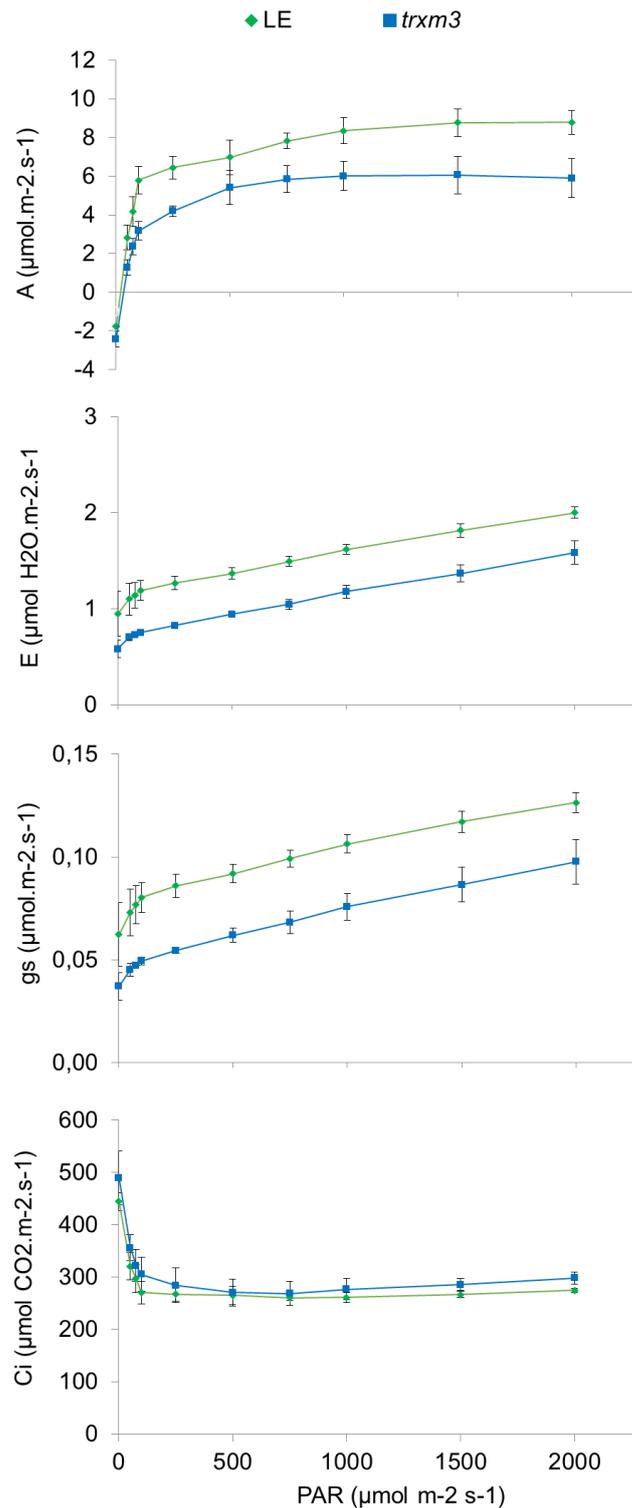


Figura 67.- Curvas de respuesta a luz de la línea mutante *trxm3* en comparación con la línea silvestre LE. Fueron obtenidas en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo: A, tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  o fotosíntesis neta; E, tasa de transpiración; g, conductancia estomática y  $C_i$ , concentración de  $\text{CO}_2$  subestomática. Cada curva consta de 8 puntos obtenidos como la media de 5 medidas independientes para cada línea. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

El programa *Photosyn Assistant* (versión 1.1.2), basado en las ecuaciones de Von Caemmerer y Farquhar fue usado para determinar los parámetros fotosintéticos que facilitan la interpretación y comparación de la fotosíntesis de las distintas líneas mutantes (Tablas 16 y 17).

Línea	$\phi$ ( $\mu\text{mol CO}_2 / \mu\text{mol fotones}$ )	$A_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$\Gamma_i$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$A_{\text{sat}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$R_{\text{day}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
Col0	0,076 $\pm$ 0,012	8,02 $\pm$ 0,47	15,63 $\pm$ 2,11	114,13 $\pm$ 20,01	-1,16 $\pm$ 0,17
<i>trxf1</i>	0,038 $\pm$ 0,007*	7,83 $\pm$ 0,52	13,54 $\pm$ 2,11	197,33 $\pm$ 51,38	-0,70 $\pm$ 0,27
<i>trxf2</i>	0,044 $\pm$ 0,004*	7,72 $\pm$ 0,60	11,11 $\pm$ 4,84	188,5 $\pm$ 10,52*	-0,45 $\pm$ 0,58
<i>trxf1 trxf2</i>	0,028 $\pm$ 0,005*	7,71 $\pm$ 0,64	6,76 $\pm$ 5,38	293,66 $\pm$ 69,60*	-0,35 $\pm$ 0,08*

Línea	$\phi$ ( $\mu\text{mol CO}_2 / \mu\text{mol fotones}$ )	$A_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$\Gamma_i$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$A_{\text{sat}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$R_{\text{day}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
Col0	0,060 $\pm$ 0,011	10,63 $\pm$ 0,37	13,98 $\pm$ 2,53	134,50 $\pm$ 29,68	-1,10 $\pm$ 0,49
<i>trxm1</i>	0,057 $\pm$ 0,012	9,90 $\pm$ 1,10	12,83 $\pm$ 0,59	109,66 $\pm$ 1,20	-1,38 $\pm$ 0,31
<i>trxm2</i>	0,048 $\pm$ 0,004	9,17 $\pm$ 0,73	13,57 $\pm$ 1,37	131,46 $\pm$ 21,53	-1,09 $\pm$ 0,05
<i>trxm4</i>	0,051 $\pm$ 0,006	8,07 $\pm$ 0,37**	12,73 $\pm$ 2,02	116,80 $\pm$ 18,20	-0,98 $\pm$ 0,02
LE	0,065 $\pm$ 0,018	9,17 $\pm$ 0,97	9,09 $\pm$ 2,38	87,86 $\pm$ 17,82	-0,98 $\pm$ 0,02
<i>trxm3</i>	0,038 $\pm$ 0,018	6,60 $\pm$ 0,90*	11,65 $\pm$ 0,37	110,20 $\pm$ 9,63	-1,18 $\pm$ 0,14

Tablas 16 y 17.- Parámetros estimados con *Photosyn Assistant* a partir de los valores de las curvas AQ de las líneas control y mutantes:  $\phi$ , eficiencia cuántica aparente;  $A_{\text{max}}$ , valor de fotosíntesis neta máxima;  $\Gamma_i$ , punto de compensación de luz;  $A_{\text{sat}}$ , punto estimado de saturación por luz; y  $R_{\text{day}}$ , tasa de respiración mitocondrial aparente. Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Los parámetros se calcularon como media de 4 medidas independientes para cada línea y se representan las medias  $\pm$  desviación estándar de su media. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\* $p < 0,05$  según t-student).

A la vista de los resultados obtenidos, el parámetro  $R_{\text{day}}$  disminuyó de 0,4, 0,6 y 0,7 en *trxf1*, *trxf2* y *trxf1f2* respectivamente en relación a Col0, siendo significativo solo para el doble mutante.  $A_{\text{max}}$  alcanzó el valor de 8,02 para Col0, y fue ligeramente inferior para los mutantes *trxf*.

Se observa que los valores de eficiencia cuántica aparente ( $\phi$ ), los valores de los mutantes *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2* son menores que los correspondientes a la línea control, Col0.

En relación a las líneas mutantes *trxs m* solo la isoforma *m1* tiene una  $R_d$  incrementada de 1,25 veces con respecto a Col0. La línea Col0 alcanzó una  $A_{max}$  de 10,63, los valores de las líneas *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* fueron menores, siendo esta última la que fué significativamente diferente. La  $A_{max}$  de *trxm3* disminuyó muy significativamente un 28% en relación al control LE.

### C.3.2.- Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II.

En la tabla 18 se muestran los valores de la fluorescencia de la clorofila, Fv/Fm de los mutantes, así como de sus respectivos controles.

Los valores de Fv/Fm correspondientes a las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2* y *trxm4*, fueron significativamente mayores en relación a la línea Col0, mientras que el mutante *trxm3* presentó un valor para este parámetro significativamente menor al de la línea silvestre LE.

Línea	Fv/Fm
Col0	0,849 ± 0,006
<i>trxf1</i>	0,866 ± 0,006***
<i>trxf2</i>	0,864 ± 0,004***
<i>trxf1 trxf2</i>	0,865 ± 0,006***
<i>trxm1</i>	0,852 ± 0,003
<i>trxm2</i>	0,855 ± 0,003
<i>trxm4</i>	0,861 ± 0,003**
LE	0,855 ± 0,002
<i>trxm3</i>	0,851 ± 0,001**

Tabla 18.- Valores de Fv/Fm obtenidos de cada línea usando hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Previa medición las plantas fueron adaptadas a oscuridad. La emisión de fluorescencia basal (F0) y máxima (Fm) se obtuvieron mediante el sistema PEA. Se representan las medias de 9 plantas independientes ± su desviación estándar. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  según t-student).

### C.3.3.- Inmunodetección de proteínas implicadas en la cadena de transporte electrónico fotosintético.

Mediante el uso de anticuerpos específicos (Agrisera) se analizaron los niveles de PsbD, que forma parte del núcleo del centro de reacción del PSII, y de PsbO y PsbP, proteínas extrínsecas del complejo de fotólisis del H<sub>2</sub>O en el PSII. Todos los mutantes analizados mostraron mayores niveles de acumulación de PsbP, sensiblemente mayor en los mutantes *trxf1* y *trxm3* (Figura 68), sugiriendo modificaciones en el complejo de fotólisis del H<sub>2</sub>O. Los cambios en PsbO, aunque más evidentes en *trxm1* y *trxm3*, no parecieron diferencias tan acusadas con los silvestres como con PsbP. Sin embargo, los mayores niveles de la proteína PsbD en las líneas *trxf1*, *trxf2* y *trxm3* sugieren adaptaciones del núcleo del PSII en respuesta a la falta de estas proteínas.

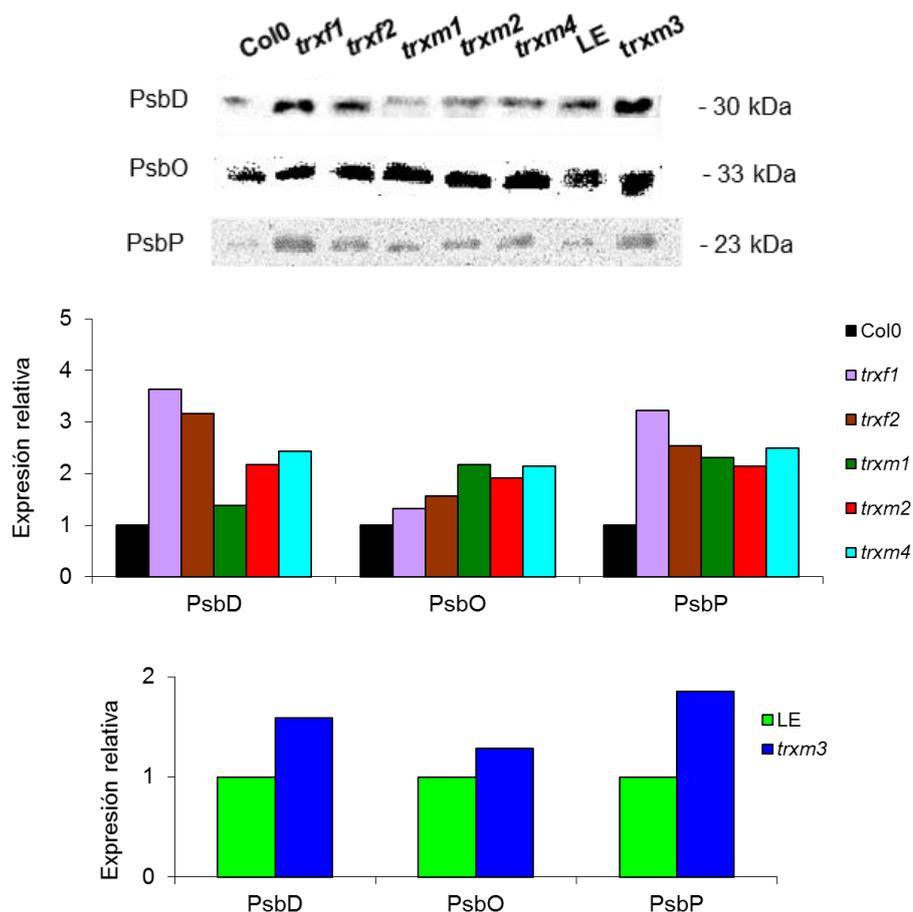


Figura 68.-Reconocimiento inmunológico (arriba) y cuantificación de la señal obtenida (abajo) de las proteínas PsbD, PsbO y PsbP en las líneas silvestres y mutantes *trx*.

#### C.4.- Adaptaciones del metabolismo de carbohidratos en respuesta a la ausencia de cada isoforma de TRX *f* o *m*.

##### C.4.1.- Análisis de la expresión de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos.

A fin de analizar la expresión en las líneas mutantes de los transcritos correspondientes a algunos genes clave en el metabolismo de carbohidratos, como es el caso de los codificantes para las proteínas SBP (*AtSBP*), cFBP1 (*AtcFBP1*), AGP (*AtAGP*) y NADPH<sup>+</sup>-MDH (*AtMDH*), se llevó a cabo la cuantificación de éstos mediante RT-qPCR (Figura 69).

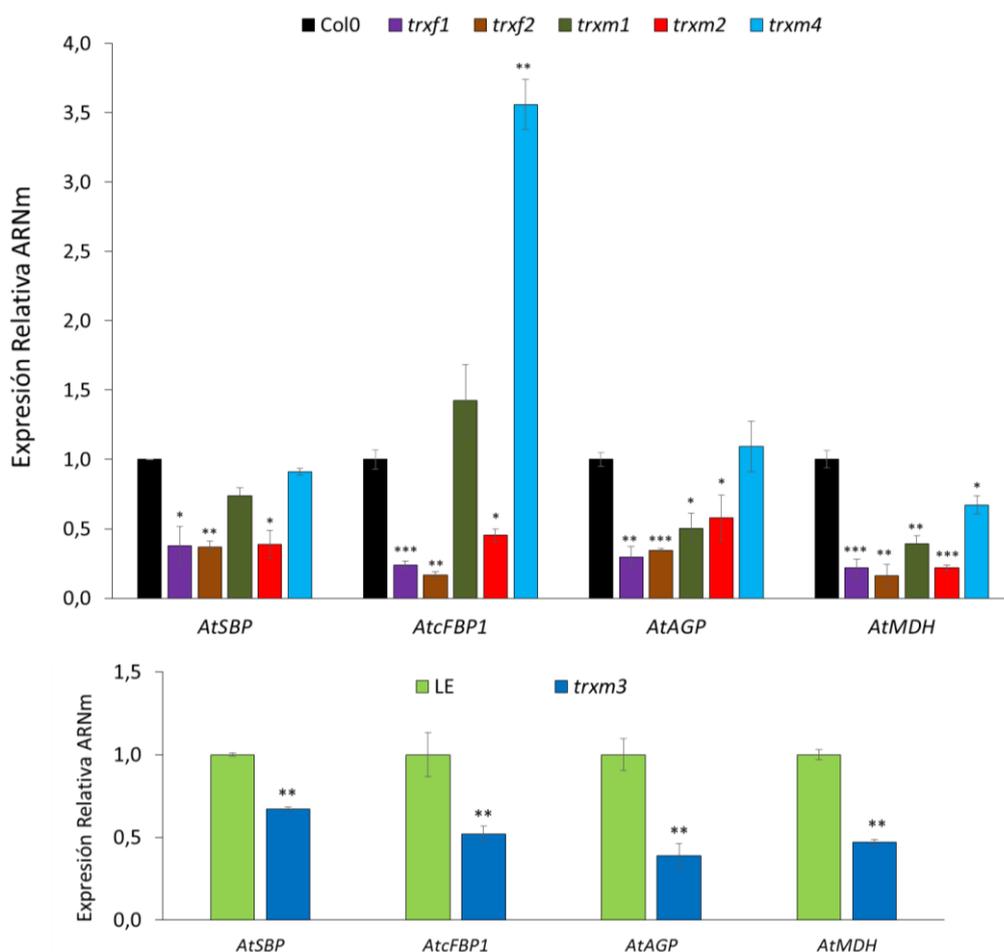


Figura 69.- Expresión relativa de los genes *AtSBP*, *AtcFBP1*, *AtAGP* y *AtMDH* en las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* respecto a la línea control *Col0* (arriba) y de la línea mutante *trxm3* respecto a la línea control *LE* (abajo). Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron usando como molde ADNc retrotranscrito de muestras de ARN aislado de hojas de 25 días. Las plantas crecieron bajo condiciones de día largo. Los niveles de transcripción son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes que se normalizaron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para relativizar los niveles de expresión se utilizaron los valores de *AtSBP* en *Col0* (arriba) y *LE* (abajo). Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  según *t*-student).

Con el mismo objeto se realizó la cuantificación mediante RT-qPCR de los genes que codifican para las proteínas *PRK* (*AtPRK*) y la *GAPDH* (*AtGAPDH*) activados/inactivados por las 3 isoformas de la proteína redox CP12 (*AtCP12-1*, *AtCP12-2* y *AtCP12-3*) (Figura 70).

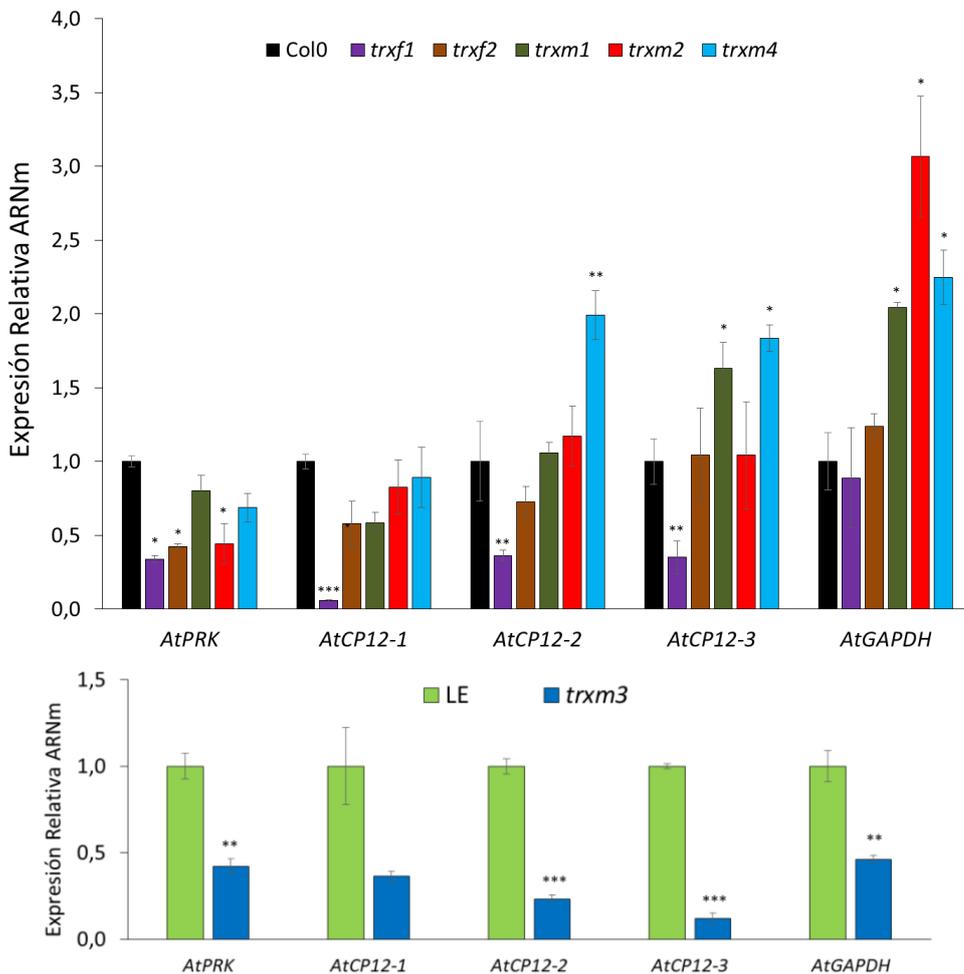


Figura 70.- Expresión relativa de los genes *AtPRK*, *AtCP12-1*, *AtCP12-2*, *AtCP12-3* y *AtGAPDH* en las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* respecto a la línea control *Col0* (arriba) y de la línea mutante *trxm3* respecto a la línea control *LE* (abajo). Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron usando como molde ADNc retrotranscrito de muestras de ARN aislado de hojas de 25 días. Las plantas crecieron bajo condiciones de día largo. Los niveles de transcripción son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes que se normalizaron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para relativizar los niveles de expresión se utilizaron los valores de *AtPRK* en *Col0* (arriba) y *LE* (abajo). Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  según *t*-student).

Como se observa, las líneas mutantes experimentaron variaciones significativas respecto a las líneas *wild type* para la expresión de uno o varios de estos genes. Estas variaciones se recogen en las tablas 19 y 20.

Línea	Gen			
	<i>AtSBP</i>	<i>AtFBPCI</i>	<i>AtAGP</i>	<i>AtMDH</i>
<i>trxf1</i>	38%*	24%***	30%**	22%***
<i>trxf2</i>	37%**	17%**	35%***	16%**
<i>trxm1</i>	74%	143%	50%*	39%**
<i>trxm2</i>	39%*	45%*	58%	22%***
<i>trxm3</i>	67%***	52%**	39%**	47%**
<i>trxm4</i>	91%	356%**	109%	67%*

Línea	Gen				
	<i>AtPRK</i>	<i>AtCP12-1</i>	<i>AtCP12-2</i>	<i>AtCP12-3</i>	<i>AtGAPDH</i>
<i>trxf1</i>	34%*	6%***	36%**	165%**	89%
<i>trxf2</i>	42%*	58%	73%	95%	124%
<i>trxm1</i>	80%	58%	106%	163%*	204%*
<i>trxm2</i>	44%*	83%	117%	104%	307%*
<i>trxm3</i>	42%**	36%	23%***	12%***	46%**
<i>trxm4</i>	69%	89%	199%	183%*	225%*

Tablas 19 y 20.- Expresión relativa de los genes *AtSBP*, *AtcFBP1*, *AtAGP* y *AtMDH* (tabla superior) y de los genes *AtPRK*, *AtCP12-1*, *AtCP12-2*, *AtCP12-3* y *AtGAPDH* (tabla inferior) en las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* expresadas en % respecto la expresión en las líneas silvestres *Col0* y *LE*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  según *t*-student).

Del análisis de los perfiles de expresión mostrados se aprecia que, en los mutantes *trxf1* y *trxf2* existe una disminución significativa de la expresión génica de todas las enzimas cuantificadas excepto *AtGAPDH*. Para el caso de la línea *trxm1* se observó una represión de los transcritos de los genes *AtAGP* y *AtMDH*, mientras que la de resultó *AtGPDH* inducida. Además mostró un incremento en la de *AtCP12-3*. En *trxm2*, la ausencia de *TRXm2* reprimió la expresión de todos los genes codificantes de este ensayo, excepto *AtGPDH* que experimentó una inducción importante. El mutante *trxm4* mostró un incremento de forma significativa la expresión de *AtcFBP1* y *AtGPDH* con respecto a *Col0*, mientras la expresión de *AtMDH* disminuyó, y por el contrario se vio aumentada la de *AtCP12-2* y *AtCP12-3*. Por último, la línea *trxm3* presentó reprimida la expresión génica de todas las enzimas cuantificadas en comparación con *LE* excepto para el gen *AtCP12-1*.

#### C.4.2.- Inmunodetección de proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos.

Dos enzimas clave en las rutas gluconeogénicas del cloroplasto (biosíntesis de almidón) y del citosol (biosíntesis de sacarosa) son las isoformas de FBPasa cFBP1 y cyFBP, respectivamente. La obtención de anticuerpos policlonales frente a estas proteínas en trabajos anteriores del grupo de investigación permitió el análisis del contenido proteico de cada isoforma de FBPasa en los distintos mutantes *trx* (Figura 71).

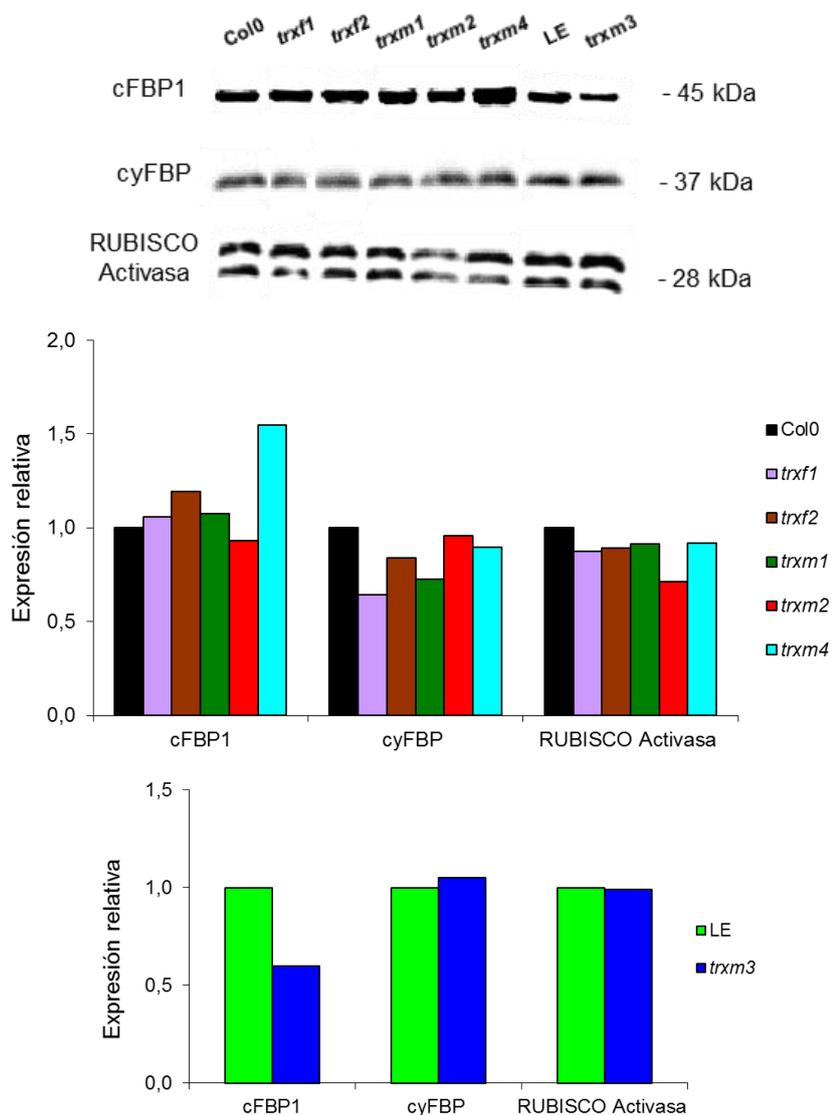


Figura 71.- Reconocimiento inmunológico y cuantificación de la señal obtenida (abajo) de la cFBP1, cyFBP y la RUBISCO Activasa (arriba). Se utilizaron los anticuerpos cFBP1, cyFBP y RUBISCO activasa frente a 30  $\mu$ g de extracto de roseta pertenecientes a las líneas control Col0 y LE y los mutantes *trx1*, *trx2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*. Las plantas crecieron durante 25 días bajo condiciones de día largo.

El reconocimiento inmunológico de la cFBP1 reveló una mayor intensidad de señal mediante el programa *Image J* para el mutante *trxm4* y una menor señal en *trxm3*, ambos resultados coincidieron con los datos de cuantificación de los niveles de ARNm. Sin embargo, en el resto de mutantes, excepto en *trxm1*, no se observó una correlación con la disminución de transcritos registrada. Esta falta de correlación podría explicarse por mecanismos de regulación post-transcripcional.

La otra isoforma de FBPasa no presentó variaciones observables entre líneas mediante la técnica de *western-blotting*.

Por otro lado, utilizando un anticuerpo comercial (Agrisera) frente a la RUBISCO activasa no se apreciaron cambios apreciables en las líneas mutantes con respecto a las silvestres, con la única excepción de la línea *trxm2*, con un aparente menor contenido en RUBISCO activasa que el resto de líneas

#### C.4.3.- Determinación de glucosa, sacarosa y fructosa.

La determinación del contenido de glucosa, fructosa y sacarosa se realizó en los extractos de hojas de roseta de 25 días recogidas al inicio del ciclo de luz de día largo. En este estado fisiológico se observaron variaciones significativas en la cantidad de azúcares solubles medidos en los mutantes (Figura 72).

Los valores de glucosa medidos en las líneas *trxf2* y *trxm4* fueron significativamente menores y próximos a la mitad del obtenido para Col0 (55, 36 y 47%, respectivamente); en cuanto al mutante *trxm3*, éste también mostró significativamente un valor menor de 34% en relación al de su línea control, LE.

El contenido de fructosa de las líneas mutantes respecto a los controles silvestres, fue significativamente bajo en el caso de los mutantes *trxf2*, *trxm2* y *trxm4* con un contenido 24, 27 y 22% respectivamente menor que el de Col0. Por último, los valores de sacarosa de las líneas mutantes no mostraron ninguna variación significativa con respecto a las plantas control.

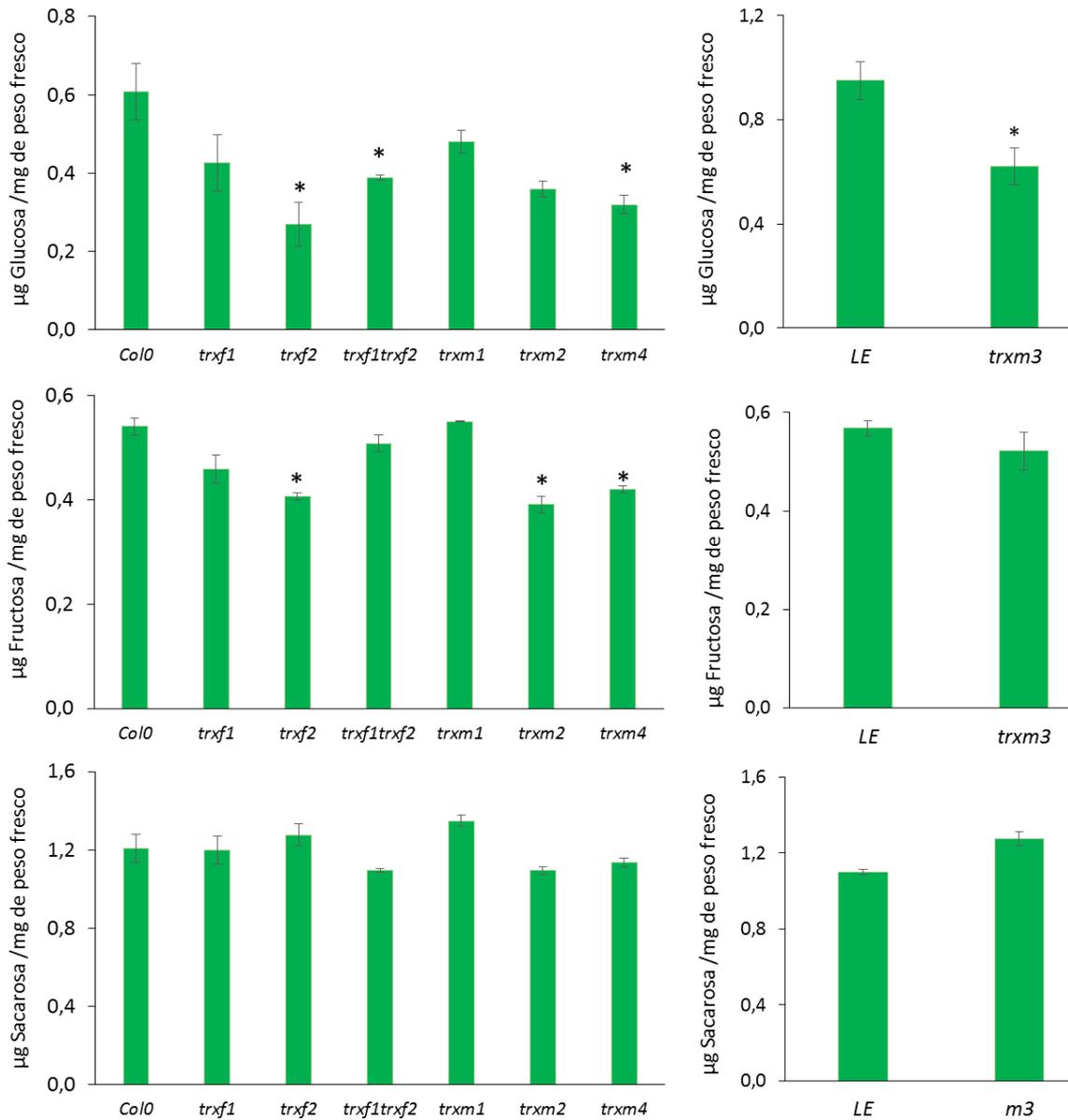


Figura 72.- Determinación del contenido en glucosa, fructosa y sacarosa en líneas mutantes y control al inicio del ciclo de luz (0 h). Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de su media. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\* $p < 0,05$  y \* $p < 0,01$  según *t*-student).

#### C.4.4.- Contenido en almidón a lo largo del ciclo de luz.

Se determinó el contenido de almidón a las 0, 8 y 16 h del fotoperiodo para poder evaluar el proceso metabólico del mismo a lo largo de un ciclo día/noche. Los resultados de muestran en las figuras 73 y 74, mientras que las variaciones encontradas entre líneas son detalladas en la tabla 21.

El almidón contenido en los mutantes *trxf2* y *trxf1trxf2* a las 0 horas, fue significativamente menor que el cuantificado para Col0 (Figura 73A). Dicho patrón se mantiene, también significativamente, para el doble mutante *trxf1 trxf2* a las 8 y 16 horas del ciclo de luz. Estas observaciones fueron corroboradas por las tinciones realizadas con lugol de hojas de roseta.

En dichas hojas, recogidas en los mismos momentos del ciclo de luz que las empleadas en realizar la determinación enzimática de almidón (Figura 73B), se aprecia la menor coloración en las líneas *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2* a las 0 horas y para el mutante *trxf1trxf2* a las 8 y 16 horas, indicando que contienen menos almidón.

Por otro lado, a las 0 horas del ciclo de luz el contenido en almidón dentro de los mutantes *trxm1* y *trxm2* almidón resultó significativamente menor al cuantificado para Col0 (Figura 74A). Esta tendencia no se observó ni a las 8h ni a las 16 horas del ciclo de luz. En el caso del mutante *trxm3* el valor de almidón cuantificado fue menor, aunque de forma significativa, a las 0h y 8h que el registrado para su línea control, LE.

Las tinciones realizadas con lugol realizadas con los mutantes de tipo *m* confirmaron las diferencias observadas en la determinación enzimática (Figura 74B).

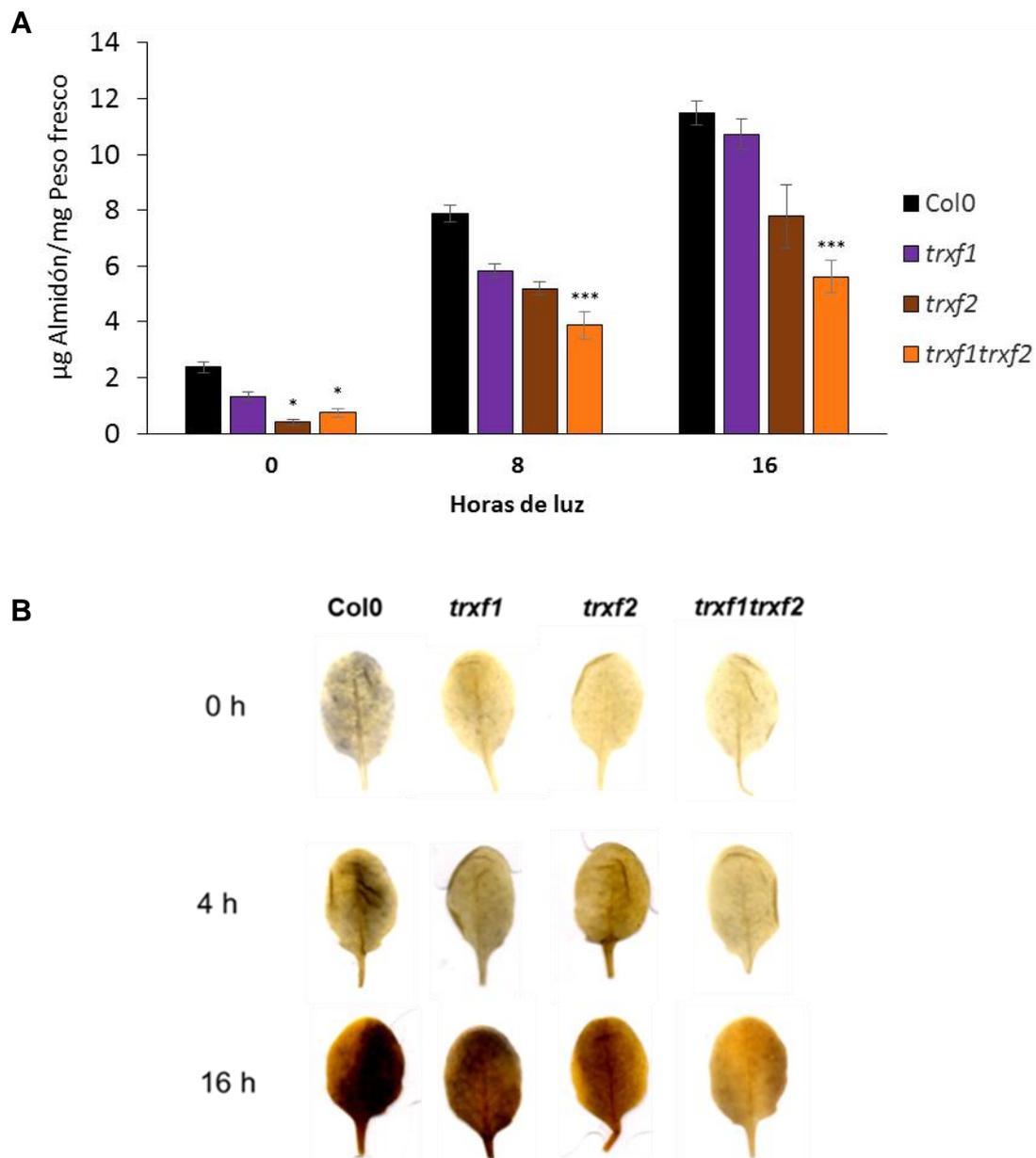


Figura 73.- Análisis del contenido en almidón en línea control Col0 y los mutantes *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2* a las 0, 8 y 16h de un ciclo de luz de día largo. Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. A) Cuantificación de almidón en hojas de roseta de 25 días. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de su media y se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  según t-student). B) Tinción con lugol en hojas de roseta de mutantes en comparación con la línea silvestre.

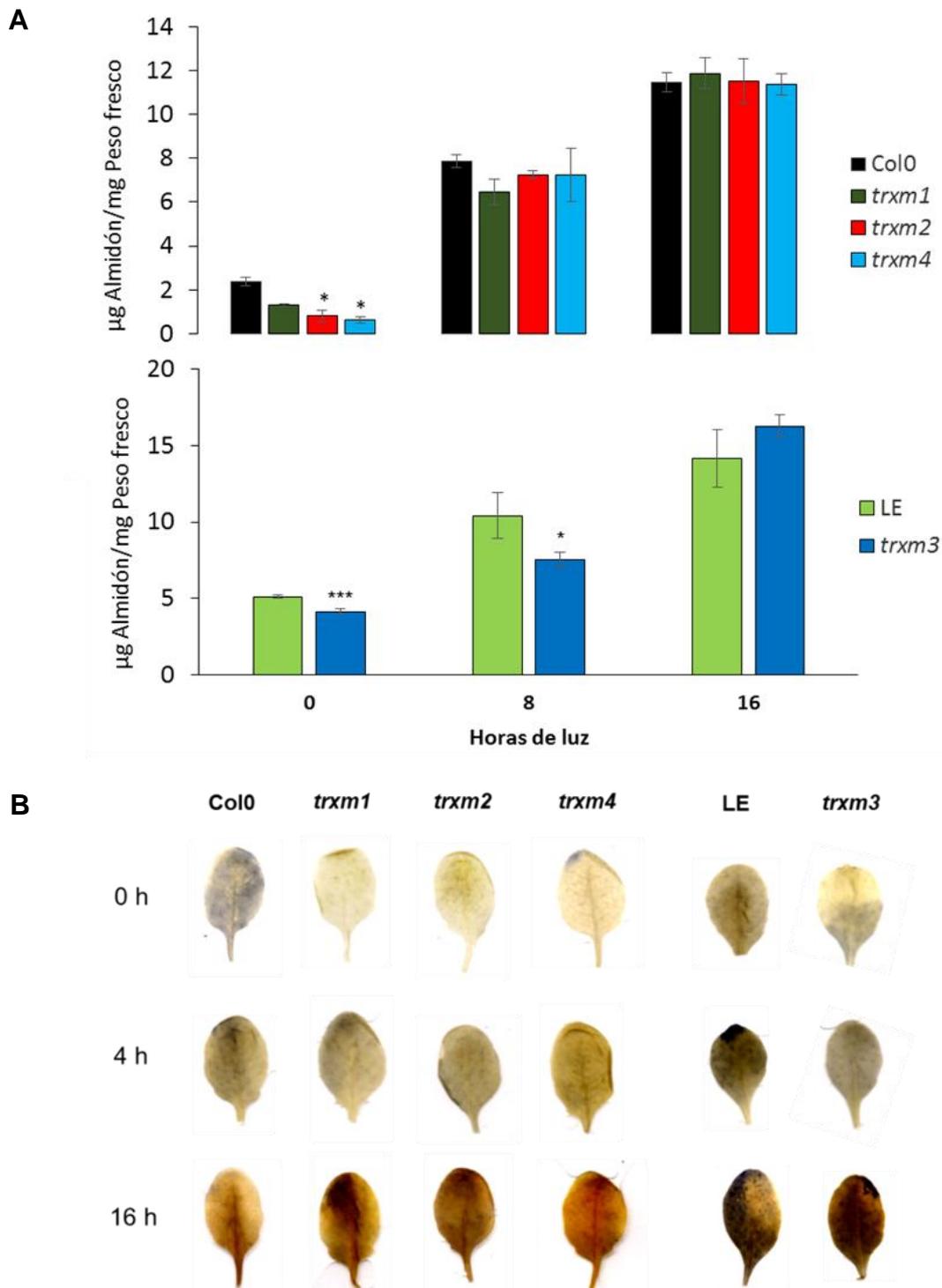


Figura 74.- Análisis del contenido en almidón en líneas control Col0 y LE y los mutantes *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* a las 0, 8 y 16h de un ciclo de luz de día largo. Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. A) Cuantificación de almidón en hojas de roseta de 25 días. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de su media y se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  según *t*-student). B) Tinción con lugol en hojas de roseta de mutantes en comparación con la línea silvestre.

Línea	Horas de luz		
	0	8	16
<i>trxf1</i>	56	74	94
<i>trxf2</i>	17*	66	68
<i>trxf1 trxf2</i>	31*	49***	49***
<i>trxm1</i>	56	82	104
<i>trxm2</i>	34*	92	100
<i>trxm3</i>	81***	72*	115
<i>trxm4</i>	26*	92	99

Tabla 21.- Variación (en %) entre las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* respecto a las líneas control Col0 y entre la línea mutante *trxm3* respecto a la línea LE, del contenido en almidón extraído a las 0, 8 y 16 h del fotoperiodo. Se han marcado con asterisco aquellos porcentajes que representan una variación significativa (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  según t-student).

### C.5.- Análisis del proteoma de las líneas mutantes *trxf* y *m*.

Los extractos de proteínas totales de las hojas de roseta de plantas de 25 días de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* y de las líneas silvestres Col0 y LE, fueron analizados en la Unidad de Proteómica de la Universidad de Córdoba (SCAI). Previamente los extractos fueron tratados para conseguir la concentración y condiciones de pureza óptimas para la separación de los péptidos mediante una electroforesis bidimensional. Se realizaron 3 réplicas por cada extracto proteico.

En las figuras 75 y 76 se muestran los *spots* correspondientes a las proteínas de cada una de las líneas analizadas.

Mediante análisis informático con el programa *PDQuest*® (Bio-rad) se seleccionaron los *spots* en cada uno de los geles de las líneas mutantes cuya expresión estaba reprimida o inducida en relación al mismo *spot* localizado en los geles de las plantas control.

Las proteínas correspondientes con los *spots* fueron digeridas y los péptidos analizados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. La comparación con las bases de datos permitieron identificar los distintos péptidos, se recoge en la tabla 22 y sus continuaciones.

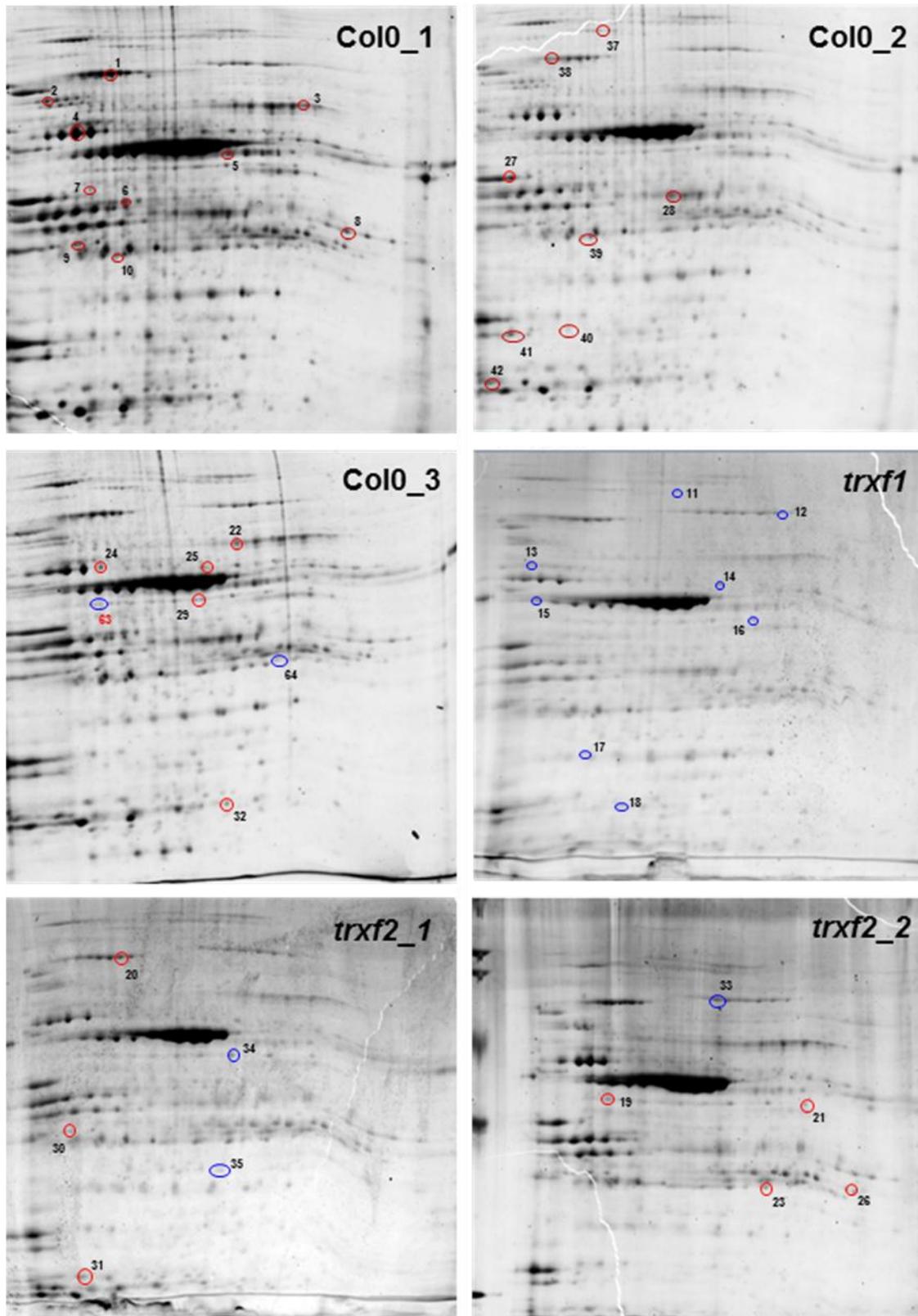


Figura 75.- Geles bidimensionales de las proteínas totales de rosetas de 25 días de las líneas Col0, *trxf1* y *trxf2*. Señalados con círculo rojo: spots correspondientes a péptidos reprimidos en las líneas mutantes; señalados con círculo azul: spots correspondientes a péptidos inducidos en líneas mutantes.

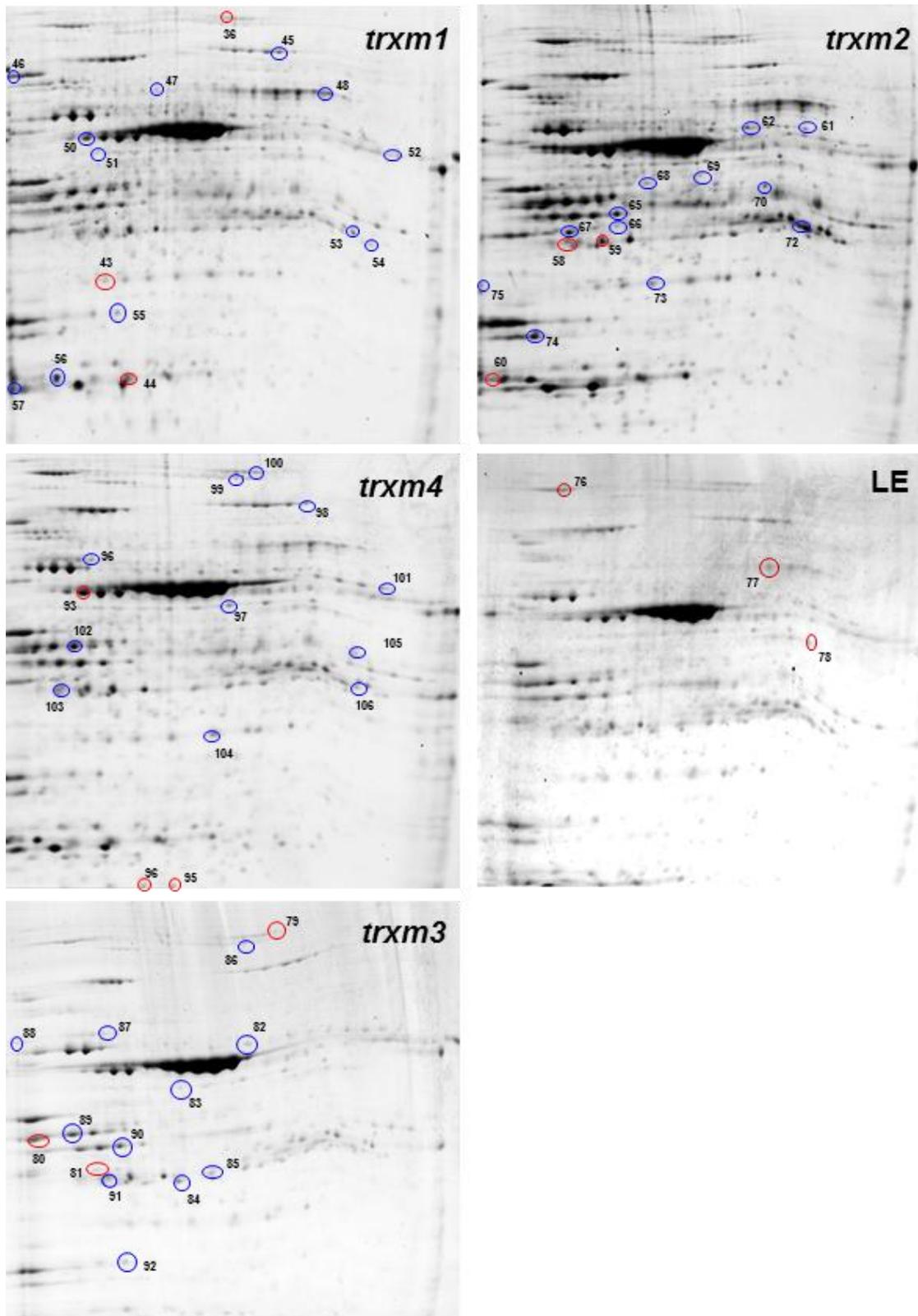


Figura 76.- Geles bidimensionales de las proteínas totales de rosetas de 25 días de las líneas *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, LE y *trxm3*. Señalados con círculo rojo: spots correspondientes a péptidos reprimidos en las líneas mutantes; señalados con círculo azul: spots correspondientes a péptidos inducidos en las líneas mutantes.

S	Péptido	PM	pl	N	ID	Gen
<b>Péptidos reprimidos. Mutante <i>trxf1</i>.</b>						
1	Transketolase-1, chloroplastic	80360	5,94	21	Q84WI5	At3g60750
2	Vacuolar-type H+ ATP synthase alpha chain	69111	5,11	22	Q0WLF6	At1g78900
3	Beta-D-glucopyranosyl abscisate beta-glucosidase	60877	6,74	9	Q9SE50	At1g52400
4	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	55351	5,19	22	P56757	Atcg00120
5	Ribulose biphosphatase carboxylase large chain (fragment)	53435	5,88	20	O03042	Atcg00490
6	Elongation factor Tu, chloroplastic	51883	5,84	12	P17745	At4g20360
7	Myrosinase-binding protein-like	48524	5,12	11	O04309	At3g16470
8	Aminomethyltransferase, mitochondrial	44759	8,55	18	O65396	At1g11860
9	Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic	44133	6,79	18	O82660	At5g23120
10	Putative clathrin assembly protein	67271	4,84	9	Q9SA65	At1g03050
<b>Péptidos activados. Mutante <i>trxf1</i>.</b>						
11	MLP-like protein 28	37819	5,2	9	Q9SSK9	At1g70830
12	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase 2	84900	6,09	7	Q94BN4	At3g03780
13	Chaperonin 60 subunit beta 1 (2) chloroplastic	64169	6,21	18	P21240	At1g55490
14	ATP synthase subunit alpha (mitochondrial)	55296	6,23	17	P92549	Atmg01190
15	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	53957	5,38	20	P19366	Atcg00480
16	Glutamate-glyoxylate aminotransferase 1	53780	6,49	21	Q9LR30	At1g23310
17	Ferredoxin-NADP+ reductase	29893	5,91	6	F4JZ46	At5g66190
18	Probable serine/threonine kinase WNK6	65509	5,05	12	Q8S8Y8	At3g18750

Tabla 22.- Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxf1*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

S	Péptido	PM	pl	N	ID	Gen
<b>Péptidos reprimidos. Mutante <i>trxf2</i>.</b>						
19	Probable mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-1	53520	5,72	8	Q0WW81	At1g51980
20	Putative transketolase	80374	5,94	11	Q8RWV0	At3g60750
21	Glutamate-glyoxylate aminotransferase 2	53980	6,21	13	Q9S7E9	At1g70580
22	Myrosinase 2	63262	7,14	10	Q9C5C2	At5g25980
23	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b chloroplastic	42764	8,19	7	Q9SA52	At1g09340
24	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	55351	5,19	18	P56757	Atcg00120
25	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	55296	6,23	18	P92549	AtMg01190
26	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36962	6,67	9	B9DGZ4	At1g13440
27	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	52347	5,87	20	P10896	At2g39730
28	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	53435	5,88	17	O03042	AtCg00490
29	Monodehydroascorbate reductase	52368	7,62	16	F4I576	At1g63940
30	Photosystem II stability/assembly factor HCF 136, chloroplastic	44133	6,79	7	O82660	At5g23120
31	Triosephosphate isomerase, cytosolic	27380	5,39	7	P48491	At3g55440
32	Carbonic anhydrase	28509	5,29	12	Q56X90	At3g01500
<b>Péptidos activados. Mutante <i>trxf2</i>.</b>						
33	5 methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	84604	6,09	21	Q6KCR2	At5g17920
34	Glutamate-glyoxylate aminotransferase 1	53780	6,49	7	Q9LR30	At1g23310
35	Malate dehydrogenase, mitochondrial	36010	8,54	6	Q9ZP06	At1g53240

Tabla 22 (Continuación).- Proteínas reprimidos (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxf2*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

S	Péptido	PM	pl	N	ID	Gen
<b>Péptidos reprimidos. Mutante <i>trxm1</i>.</b>						
36	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 2, mitochondrial	75747	6,05	13	Q93Z12	At4g33010
37	Chaperone protein ClpC1, chloroplastic	103616	6,36	20	Q9FI56	At5g50920
38	Transketolase	80245	5,99	13	F4JBY2	At3g60750
28	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	53435	5,88	17	O03042	AtCg00490
39	Protease Do-like 1, chloroplastic	46817	6	5	O22609	At3g27925
40	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	34972	8,37	10	O80934	At2g37660
41	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2, chloroplastic PsbO2	35226	5,92	17	Q9S841	At3g50820
42	Chlorophyll a-b binding protein 2, chloroplastic (Lhbc1)	28266	5,29 s	7	P0CJ48	At1g29920
43	Ferredoxin-NADP reductase FNR1	28980	5,25	11	B9DI26	At5g66190
44	Carbonic anhydrase 2, chloroplastic A, thaliana	37825	5,74	18	P27140	At3g01500
<b>Péptidos activados. Mutante <i>trxm1</i>.</b>						
45	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	84646	6,09	30	O50008	At5g17920
46	Heat shock 70 kDa protein 3	71559	4,97	16	O65719	At3g09440
47	Putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	60897	5,53	13	B9DFU6	At3g08590
48	Beta-D-glucopyranosyl abscisate beta-glucosidase	60877	6,74	18	Q9SE50	At1g52400
49	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	55296	6,23	20	P92549	Atmg01190
50	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	53957	5,38	24	P19366	Atcg00480
51	Putative mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-1	54539	5,94	12	Q9ZU25	At1g51980
52	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14-1	11989	10,24	6	Q8RV04	At2g35795
53	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic	37004	6,67	18	Q9FX54	At1g13440
54	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+) phosphorylating	37929	7,63	14	B3H4P2	At1g12900
55	Carbonic anhydrase 2, chloroplastic	28669	5,36	14	P42737	At5g14740
56	Putative photosystem II type I chlorophyll a/b binding protein (Lhb1B2)	28093	5,28	6	Q39141	At2g34420
57	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1, chloroplastic (PsbP1)	28249	6,9	7	Q42029	At1g06680

Tabla 22 (Continuación).- Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxm1*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

S	Péptido	PM	pl	N	ID	Gen
<b>Péptidos reprimidos. Mutante <i>trxm2</i>.</b>						
58	Annexin (fragment)	26494	7,03	6	B9DI12	At1g35720
59	Probable Fructose-bisphosphate aldolase	43132	6,78	10	Q944G9	At4g38970
60	(Z)-gamma-bisabolene synthase 1	64152	5,37	12	Q9T0J9	At4g13280
<b>Péptidos activados. Mutante <i>trxm2</i>.</b>						
61	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	49809	9,08	12	Q944M2	At4g14500
62	ATP synthase subunit alpha	55280	6,01	9	G1C2S9	Atcg00120
63	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic	42748	7,62	17	P25856	At3g26650
64	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b, chloroplastic	42764	8,19	15	Q9SA52	At1g09340
65	Rubisco activase	29225	4,83	3	Q0WLM1	At2g39730
66	Heat shock 70 kDa protein 14	92491	65,15	12	Q9S7C0	At1g79930
67	Photosystem II stability/assembly factor HCF136 chloroplastic	44133	6,79	17	O82660	At5g23120
68	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase B, chloroplastic	48086	6,33	10	P25857	At1g42970
69	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related protein	135898	6,66	16	Q9S9J1	At1g65110
70	Monodehydroascorbate reductase (NADH)	46629	6,41	4	Q0WUV6	At3g52880
71	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic	37004	6,67	10	Q9FX54	At1g13440
72	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+) (Phosphorylating)	37929	7,63	11	B3H4P2	At1g12900
73	Probable glutathione peroxidase 5	19486	9,28	7	Q9LYB4	At3g63080
74	Unknown protein Located in mitochondrion	10371	10,33	8	B3H6G1	At5g05113
75	Disease resistance like protein A, thaliana	111004	8,18	15	Q0WVE0	At5g40060

Tabla 22 (Continuación).- Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxm2*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

S	Péptido	PM	pl	N	ID	Gen
<b>Péptidos reprimidos. Mutante <i>trxm4</i>.</b>						
76	Lipoxygenase 2, chloroplastic	102552	5,43	24	P38418	At3g45140
77	Myrosinase 2	63262	7,14	13	Q9C5C2	At5g25980
78	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large chain	47920	6,13	11	Q85B88	Atcg00490
79	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)2, mitochondrial Ath	113822	6,51	12	Q94B78	At4g33010
80	Phosphorylase kinase 1, chloroplastic (P k 2)	50195	5,91	14	Q9LD57	At1g56190
81	Photosystem II stability/assembly factor HCF136 chloroplastic	44133	6,79	15	O82660	At5g23120
<b>Péptidos activados. Mutante <i>trxm3</i>.</b>						
82	ATP synthase subunit alpha	55222	6,23	16	G1C2Z0	AtmG01190
83	Monodehydroascorbate reductase 6	52754	7,05	12	B9DGR6	At1g63940
84	Epithiospecifier protein	37042	5,56	13	Q8RY71	At1g54040
85	ATP synthase gamma chain (fragment)	33475	6,13	11	Q9SUI9	At4g04640
86	Uncharacterized protein	57190	4,93	10	F411X8	At1g55830
87	Chaperonin 60 subunit beta 2, Chloroplastic	63702	5,6	12	Q9LJE4	At3g13470
88	Transducin/WD40 domain-containing protein	149477	5,93	16	F4JCM6	At3g33530
89	Glutamine synthetase	47780	6,43	15	B9DGD1	At5g35630
90	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	48755	7,55	20	F4IVZ7	At2g39730
91	Probable Fructose bisphosphatase aldolase Chloroplastic	43132	6,78	14	Q944G9	At4g38970
92	Carbonic anhydrase 2, chloroplastic	28669	5,36	14	P42737	At5g14740

Tabla 22 (Continuación).- Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxm3*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

S	Péptido	PM	pI	N	ID	Gen
<b>Péptidos reprimidos. Mutante <i>trxm4</i>.</b>						
93	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	53957	5,38	21	P19366	Atcg00480
94	Putative Athila retroelement ORF1 protein	57039	9,27	16	Q9ZQ07	At2g06150
95	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (fragment)	53435	5,88	10	O03042	Atcg00490
<b>Péptidos activados. Mutante <i>trxm4</i>.</b>						
96	Chaperonine 60 subunit beta 2, chloroplastic	63702	5,6	13	Q9LJE4	At3g13470
97	Glutamate-glyoxylate aminotransferase	53780	6,49	16	Q9LR30	At1g23310
98	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	84604	6,09	24	Q6KCR2	At5g17920
99	Elongation factor EF-2	74683	6,9	10	Q84R07	At1g56075
100	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 2	75747	6,05	12	Q93Z12	At4g33010
101	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	57535	8,13	15	Q9SZJ5	At4g37930
102	Glutamine synthetase	47780	6,43	10	B9DGD1	At5g35630
103	Fructose-bisphosphatase aldolase 2	41547	9,07	8	F4JUJ5	At4g38970
104	Ferredoxin-NADP reductase, leaf isozyme 2 (FNR), chloroplastic	28903	5,74	10	C0Z2A8	At1g20020
105	GDSL esterase/lipase ESM1	44374	7,59	6	Q9LJG3	At3g14210
106	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPA2, chloroplastic	37887	7,63	4	C0Z2Y9	At1g12900

Tabla 22 (Continuación).- Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxm4*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pI: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

Fueron identificados un total de 106 proteínas diferencialmente expresadas (Figura 77). De éstas, 46 están reprimidas y 61 están inducidas en relación al control. Los mutantes *trxf1* y *trxf2* tenían proporcionalmente un mayor número de proteínas reprimidas (24 sobre un total 35), mientras que los mutantes de *trxm*s tenían mayor número de proteínas inducidas (50 sobre un total de 72). El análisis de cada línea, muestra que *trxf2* tiene mayor número de proteínas reprimidos (14), mientras que la mayoría de las proteínas de *trxm2* están activadas (15).

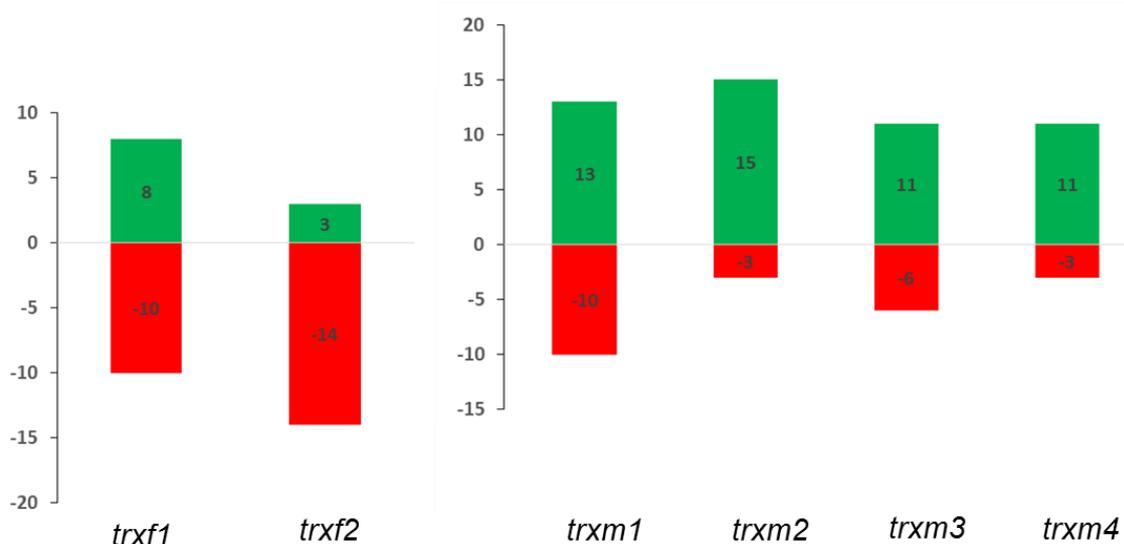


Figura 77.- Distribución de las proteínas diferencialmente expresadas en los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*. Comparación de proteínas reprimidas (rojo) y proteínas inducidas (verde).

Algunas de las proteínas diferencialmente expresados identificadas, pueden estar activadas para una línea y reprimidas para otra (Tabla 23).

	<i>trxf1</i>	<i>trxf2</i>	<i>trxm1</i>	<i>trxm2</i>	<i>trxm3</i>	<i>trxm4</i>	
<i>trxf1</i>		1	2	0	0	1	4
<i>trxf2</i>	3		0	0	0	2	2
<i>trxm1</i>	1	1		2	1	0	3
<i>trxm2</i>	0	0	0		0	0	0
<i>trxm3</i>	1	2	0	0		2	2
<i>trxm4</i>	1	1	1	0	0		11
	6	4	1	0	0	11	

Tabla 23.- Número de proteínas diferencialmente expresadas que proteínas comunes entre los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*. En verde proteínas comunes activadas, en rojo proteínas reprimidas.

Las líneas *trxf1* y *trxf2* comparten una proteína cuya expresión está reprimida, la glutamato-glioxilato aminotransferasa 1 (Q9LR30) y 3 activadas: la subunidad mayor de la ribulosa bisfosfato carboxilasa (O03042), la subunidad alfa de la ATP sintasa cloroplastica (P56757) y el factor HCF136 cloroplastico de estabilidad y ensamblado del PSII (O82660).

Las 4 líneas mutantes tipo *m* no comparten ninguna proteína diferencialmente expresada. Si bien, existen varias coincidencias cuando la comparación se realiza entre 2 líneas:

El mutante *trxm1* comparte 2 proteínas activadas con *trxm2*: la subunidad beta de la ATP sintasa cloroplastica (P19366) además de la subunidad alfa de la ATP sintasa mitocondrial (P92549) y 1 con la *trxm3*: la anhidrasa carbonica cloroplastica 2 (P42737); por otro lado tiene en común con *trxm4* una proteína reprimida, la subunidad mayor de la ribulosa bisfosfato carboxilasa (O03042). El mutante *trxm3* tienen en común con *trxm4* 2 proteínas inducidas: la subunidad beta de la chaperonina 60 Cloroplastídica 2 (Q9LJE4) y la glutamina sintetasa (B9DGD1).

También se dieron coincidencias entre mutantes de *trxf* y *m*. La línea *trxf1* comparte 2 proteínas inducidas con el mutante *trxm1*: la subunidad beta de la ATP sintasa cloroplastica (P19366) y la subunidad alfa de la ATP sintasa mitocondrial (P92549); y 1 proteína reprimida: la subunidad mayor de la ribulosa bisfosfato carboxilasa (O03042). Por otro lado, *trxf2* comparte con *trxm4* 2 proteínas inducidas, la 5-metiltetrahydropteroltriglutamato-homocisteína metiltransferasa (Q6KCR2) y la glutamato-glioxilato aminotransferasa 1 (Q9LR30) y la misma proteína esta reprimida en los mutantes *trxm1* y *trxm4*: la subunidad mayor de la ribulosa bisfosfato carboxilasa (O03042).

El análisis de las categorías funcionales y de las funciones moleculares a las que pertenecen las proteínas diferencialmente expresadas mediante el uso de la aplicación *Classification SuperViewer*, muestra que los mutantes para TRXs *f* agrupan las proteínas reprimidas en 12 categorías funcionales, y las proteínas inducidas en 11. En este grupo no se encuentra ningún representante de la categoría “desarrollo” (Figura 78). La categoría con mayor frecuencia normalizada fue la de “transporte electrónico”.

En general, se pudo detectar similitudes entre las frecuencias determinadas para las proteínas identificadas en las líneas *trxf1* y *trxf2*, no obstante se observó diferencias en la categoría de “otros procesos biológicos”, en la cual la frecuencia de las proteínas inducidas en *trxf1* fue menor que la de *trxf2*, y en la categoría de “organización celular y biogénesis” en la cual la frecuencia correspondiente a las proteínas inducidas en *trxf1* fue menor que la encontrada para *trxf2*, mientras que la frecuencia de las proteínas reprimidas en *trxf2* fue menor que la encontrada en *trxf1*.

Finalmente, habría que destacar que solo se encontraron proteínas reprimidas en la categoría “Desarrollo” para *trxf1* y *trxf2*, y “Transcripción” y “Transducción de señales” para el *trxf2*.

En cuanto a las funciones moleculares se hallaron un total de 7 para proteínas reprimidas y 9 para proteínas inducidas, no identificando ninguna proteína reprimida en las categorías de “actividad kinasa” y “función desconocida” (Figura 79). Se observaron diferencias de frecuencia normalizada de activación para las proteínas de ambas isoformas en las funciones de “actividad transferesa” y “unión a nucleótidos”; y también diferencias en las frecuencias de represión para la categoría “otras actividades enzimáticas”.

Pudieron destacarse funciones que estaban reprimidas pero no inducidas, como las de “actividad hidrolasa”, “transporte”, “unión a ADN/ARN” y “unión a proteínas” en *trxf2* y por otro lado funciones inducidas pero no reprimidas como la de “actividad kinasa” y la de “función desconocida” en *trxf1*. Por último, el mutante *trxf2* no presentó proteínas diferencialmente expresadas incluidas en “actividad kinasa”, o “función desconocida”.

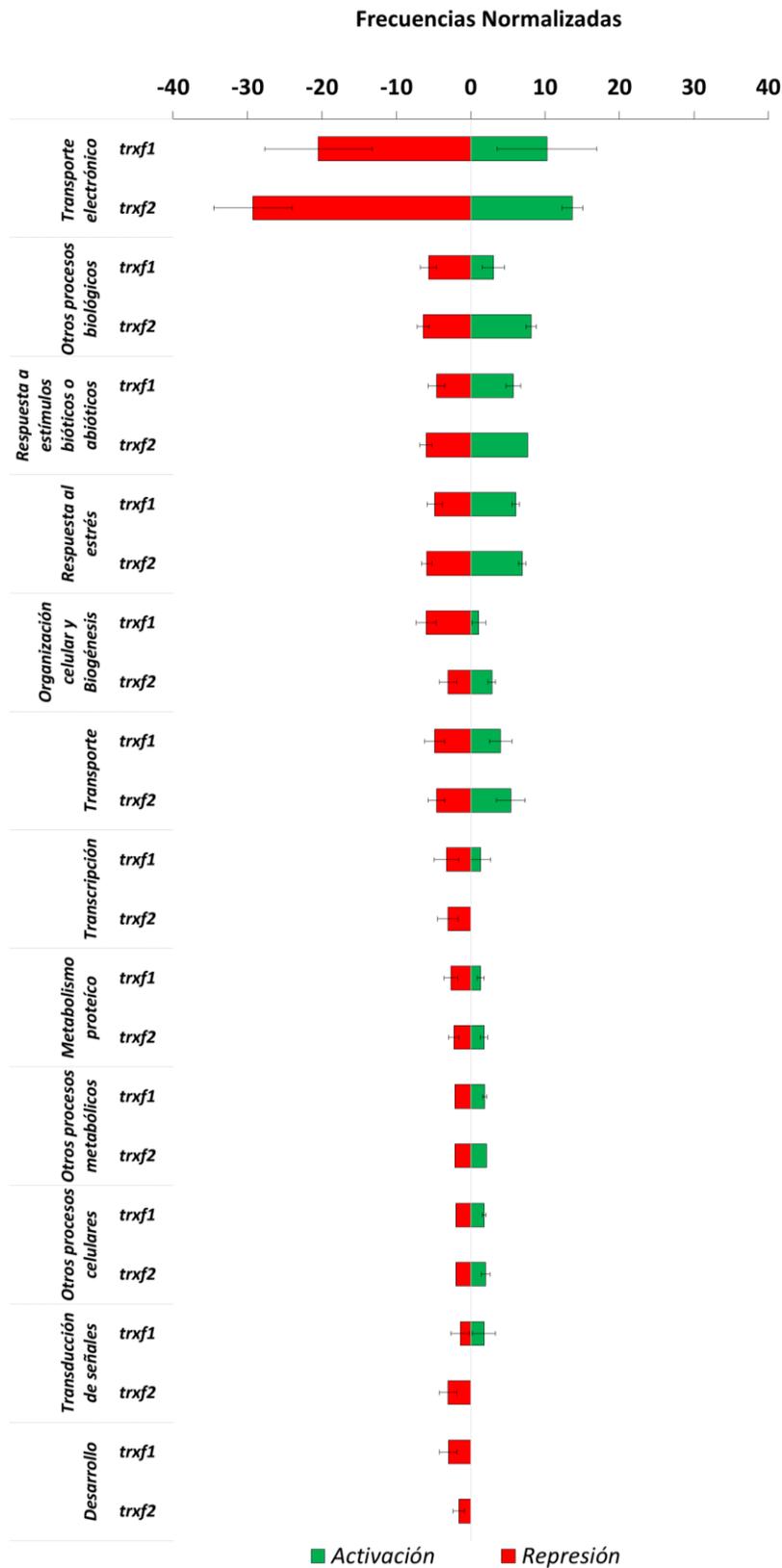


Figura 78.- Categorías funcionales en las que se agrupan las proteínas diferencialmente expresadas en los mutantes trxf1 y trxf2, comparadas por frecuencias normalizadas obtenidas mediante el uso de la aplicación informática Classification SuperViewer.

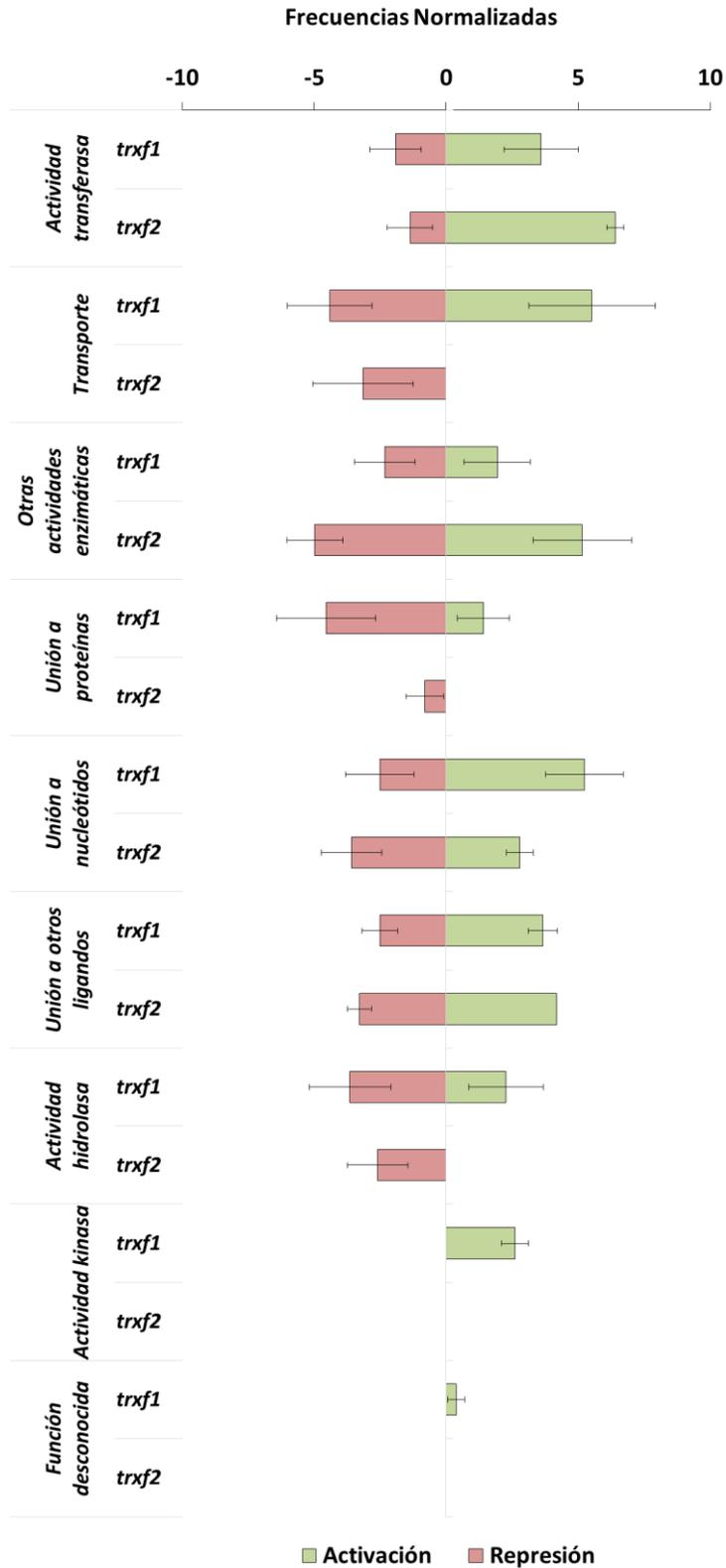


Figura 79.- Funciones moleculares de las proteínas diferencialmente expresadas en mutantes *trxf1* y *trxf2* comparadas por frecuencia normalizada obtenidas mediante el uso de la aplicación informática Classification SuperViewer.

En relación a las líneas defectivas en TRXs *m*, se determinaron 8 categorías comunes para proteínas reprimidas y 9 para proteínas inducidas, (Figura 80). La categoría con mayor frecuencia normalizada fue la de “transporte electrónico”. Sobresalieron las frecuencias correspondientes a proteínas reprimidas en la línea *trxm4* para las categorías de “transporte electrónico” y “transcripción”. Se observó una inducción, pero no represión, en las categorías de “desarrollo” y “organización celular y biogénesis”, en el caso de la línea *trxm4*; y de “transducción de señales” en el caso de los mutantes *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*.

En cuanto a las funciones moleculares asignadas, se obtuvieron un total de 10 para las proteínas reprimidas y 11 para las proteínas inducidas debido a que no aparecieron proteínas reprimidas en las categorías de “Función desconocida” (Figura 81). Sobresalieron, por su mayor frecuencia de proteínas reprimidas sobre la determinada para el resto de mutantes, *trxm1* y *trxm2* en “otras actividades enzimáticas”; *trxm1* en “unión a ADN/ARN”; *trxm3* en “actividad kinasa” y “actividad transferasa”; y *trxm4* en “transporte”, “actividad hidrolasa” y “otras funciones moleculares”. En cuanto a la frecuencia de proteínas reprimidas, destacaron *trxm1* en “unión a ligandos” y “actividad transferasa”; *trxm3* en “otras funciones moleculares”; *trxm4* en “otras actividades enzimáticas”, “unión a ADN/ARN” y “actividad transferasa”. Aparecieron funciones donde se observa solo activación pero no represión como la actividad hidrolasa (en el caso de *trxm2*), “actividad transferasa” (*trxm4*), “transporte” (*trxm1*, *trxm2* y *trxm3*), “unión a ARN/ADN” (*trxm2* y *trxm4*), “unión a nucleótidos” (*trxm3*), “unión a proteínas” (*trxm4*) y “otras actividades enzimáticas” (*trxm3*); así mismo se observan categorías en las cuales solo hay represión pero no inducción, como es el caso de la “actividad transferasa” (*trxm3*), “transporte” (*trxm4*). Por último se observó que no hay proteínas diferencialmente expresadas con “actividad transferasa” en el mutante *trxm2*, ni en la categoría de “unión a ARN/ADN” en el mutante *trxm3*.

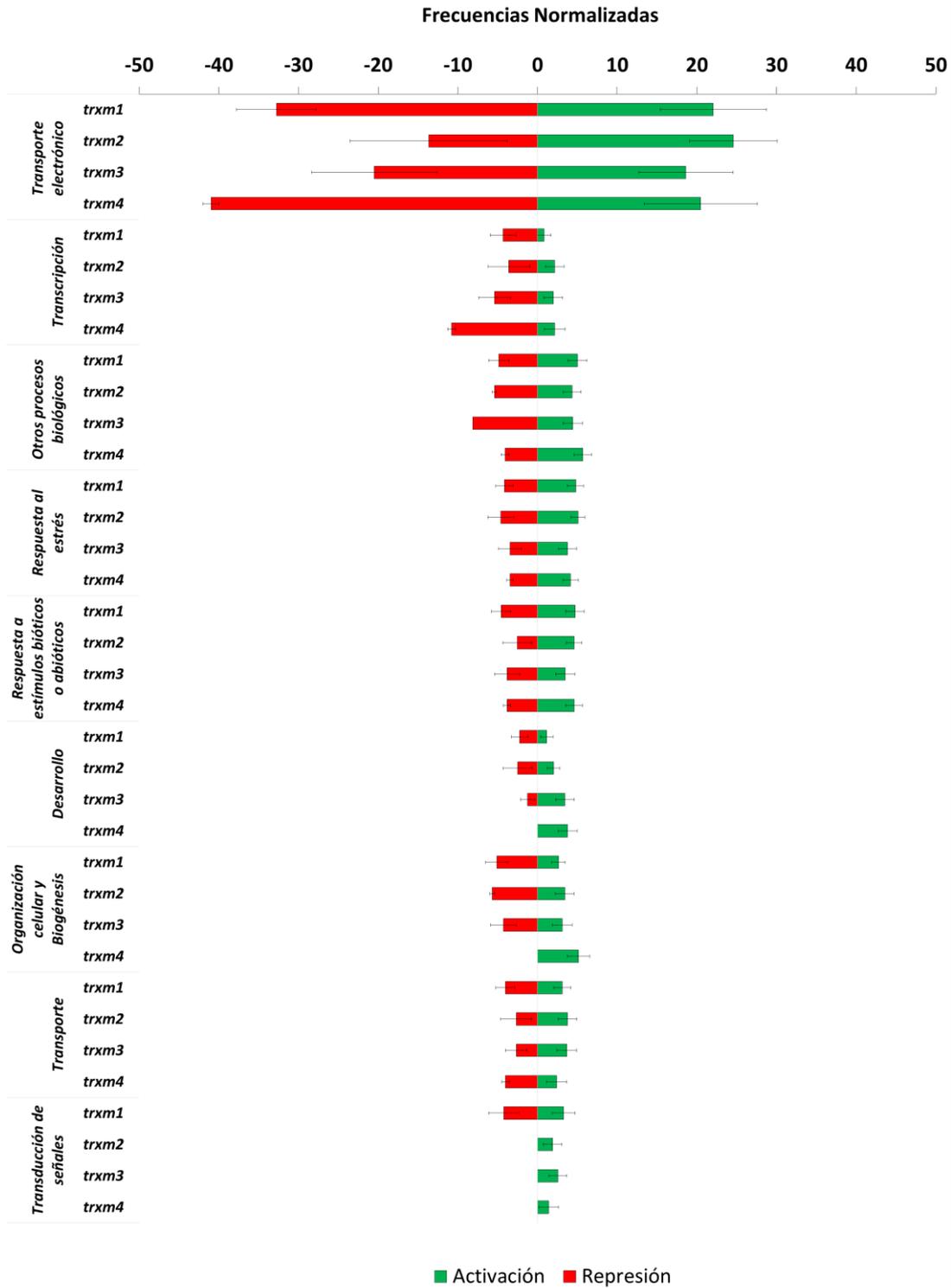


Figura 80.- Categorías funcionales en las que se agrupan las proteínas diferencialmente expresadas en los mutantes *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*, comparadas por frecuencias normalizadas obtenidas mediante el uso de la aplicación informática Classification SuperViewer.

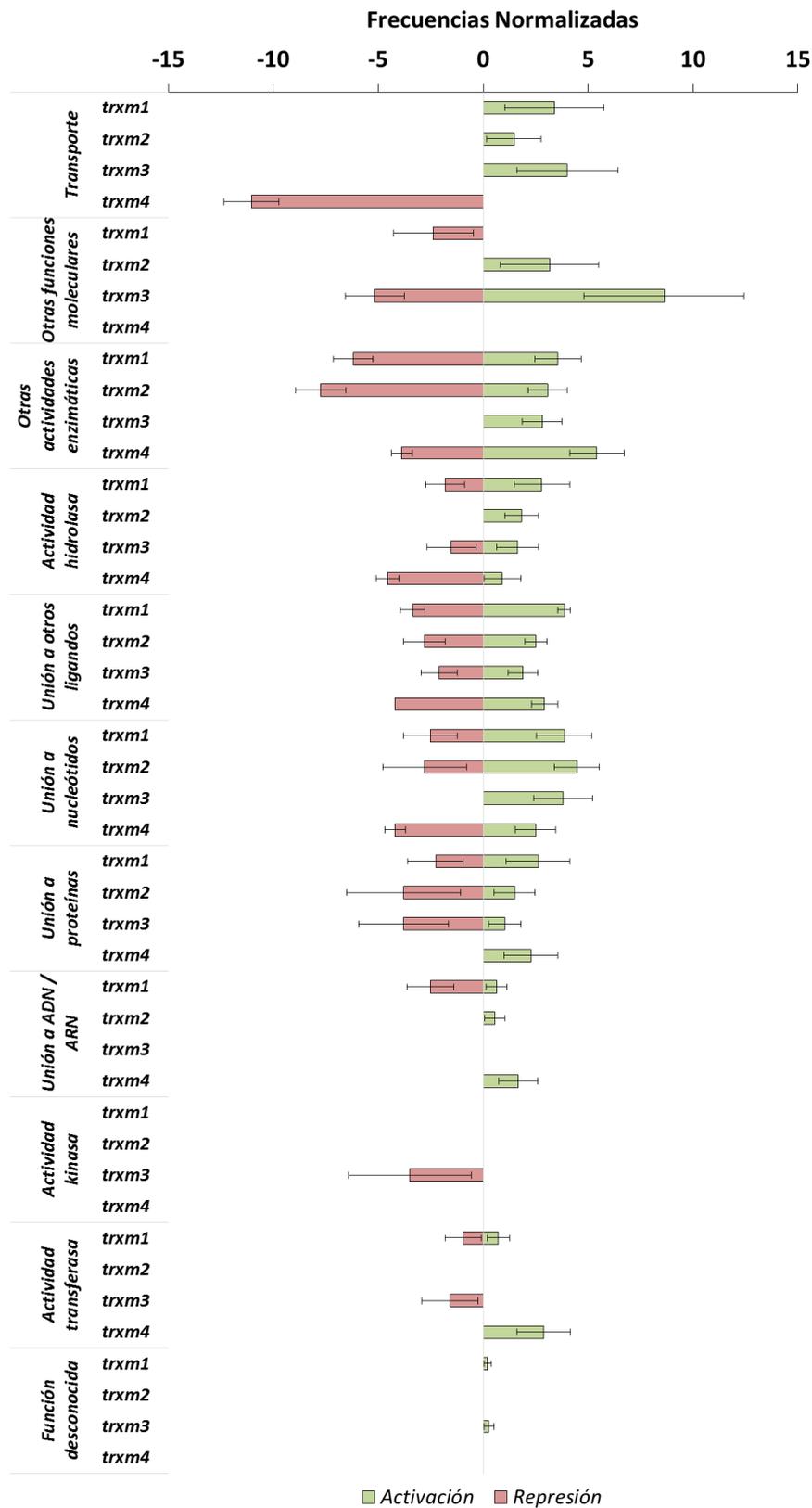


Figura 81.- Funciones moleculares de las proteínas diferencialmente expresadas en los mutantes *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* comparadas por frecuencia normalizada obtenidas mediante el uso de la aplicación informática Classification SuperViewer.

## D.- Estudio de líneas defectivas en TRXs *f* y *m* de *Arabidopsis* en condiciones de estrés.

### D.1.- Respuesta y adaptación al estrés por luz.

Mantenidas en condiciones de luz continua (600 PAR) y una temperatura constante de 20 °C durante 8 días se observa que los líneas mutantes con ecotipo Col0 presentaron hojas de roseta con una tonalidad más oscura que la línea control (Figura 82A).

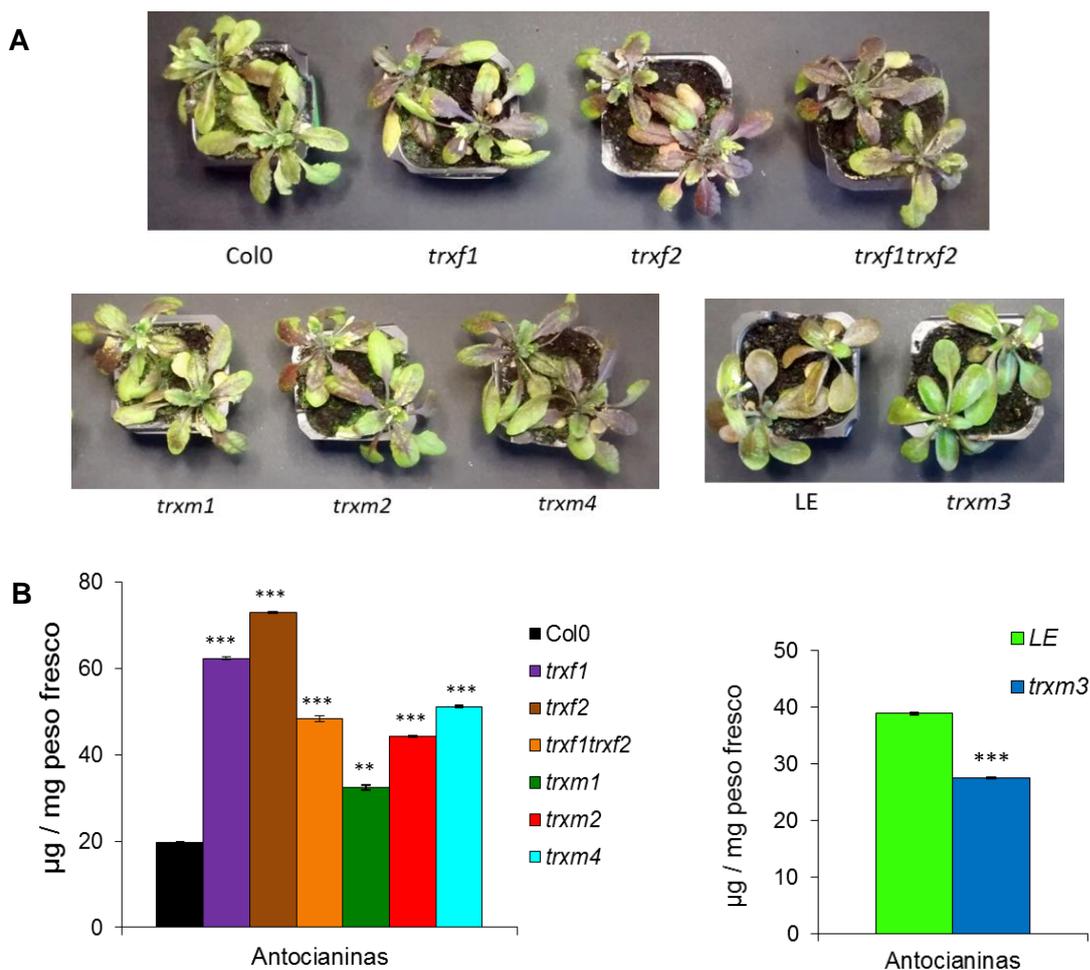


Figura 82.- Fenotipos de las líneas silvestres Col0 y LE, y los mutantes *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* bajo condiciones de estrés por alta intensidad lumínica. Las plantas crecieron durante 25 días bajo condiciones de día largo. A) Fenotipos obtenidos después de un tratamiento de 8 días a 600 PAR y una temperatura constante de 20 °C durante 24 h. B) Contenido de antocianinas en las hojas de roseta de las plantas sometidas a tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 4 individuos por línea. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  según *t*-student).

La determinación del contenido de antocianinas en hojas de roseta señaló significativamente que los mutantes simples *trxf1* y *trxf2* presentaban casi 3 veces más contenido en este pigmento que Col0. En el caso de *trxf1 trxf2*, *trxm2*, y *trxm4* este aumento supuso 2 veces aproximadamente el valor control y algo menos para *trxm1*. Al contrario que el resto de líneas, el mutante *trxm3* se vió menos afectado por el tratamiento de luz continua respecto a la línea control, LE. La cuantificación de antocianinas confirmó significativamente este fenotipo (Figura 82B).

## D.2.- Respuesta y adaptación al estrés oxidativo.

### D.2.1.- Acumulación de ROS en condiciones fisiológicas normales.

Los mutantes *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2* mostraron similar grado de coloración que la línea Col0 tras la tinción histoquímica DAB y más intensidad que dicha línea control en el caso de la tinción con NBT, indicando un mayor contenido de  $O_2^-$  (Figura 83).

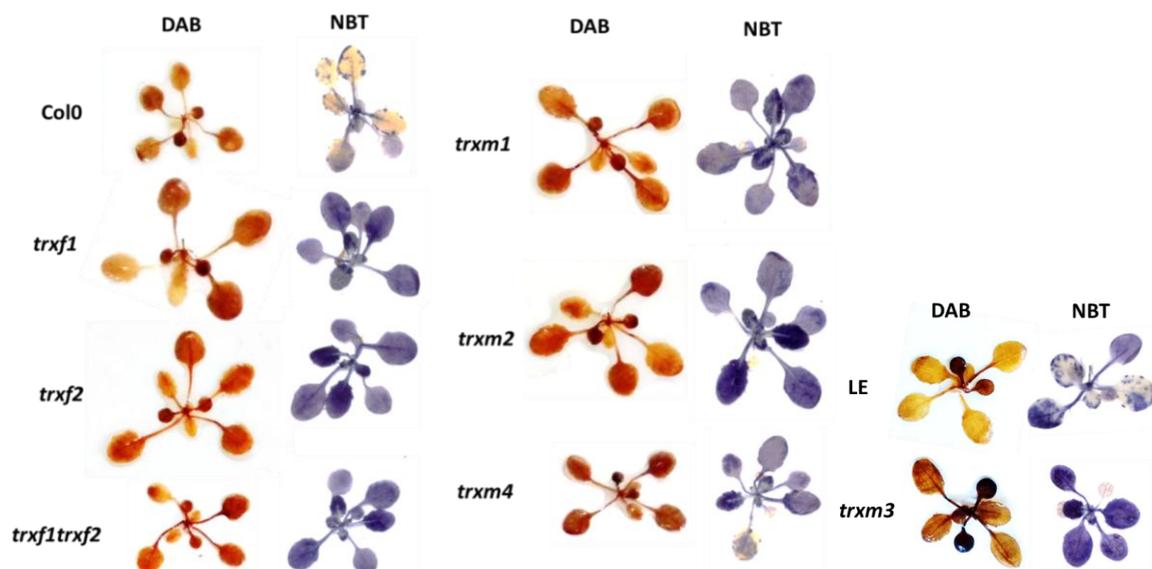


Figura 83.- Acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en hojas de roseta de las líneas control Col0 y LE, y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*. Tras 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo las plantas fueron sometidas in situ a las tinciones histoquímicas 3,3'-diaminobencidina (DAB) y nitrozul de tetrazolio (NBT) para mostrar los niveles acumulados de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ .

D.2.2.- Inmunodetección de proteínas implicadas en en procesos de detoxificación de ROS.

La 2-Cys PRX es una enzima cloroplastídica con actividad peroxidasa o de eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que podría servir como marcador de estrés oxidativo en el cloroplasto. Sin embargo, las líneas analizadas no mostraron incrementos en 2-Cys PRX en ninguna línea estudiada, mostrando incluso un menor contenido en *trxf2* y *trxm2* (Figura 84).

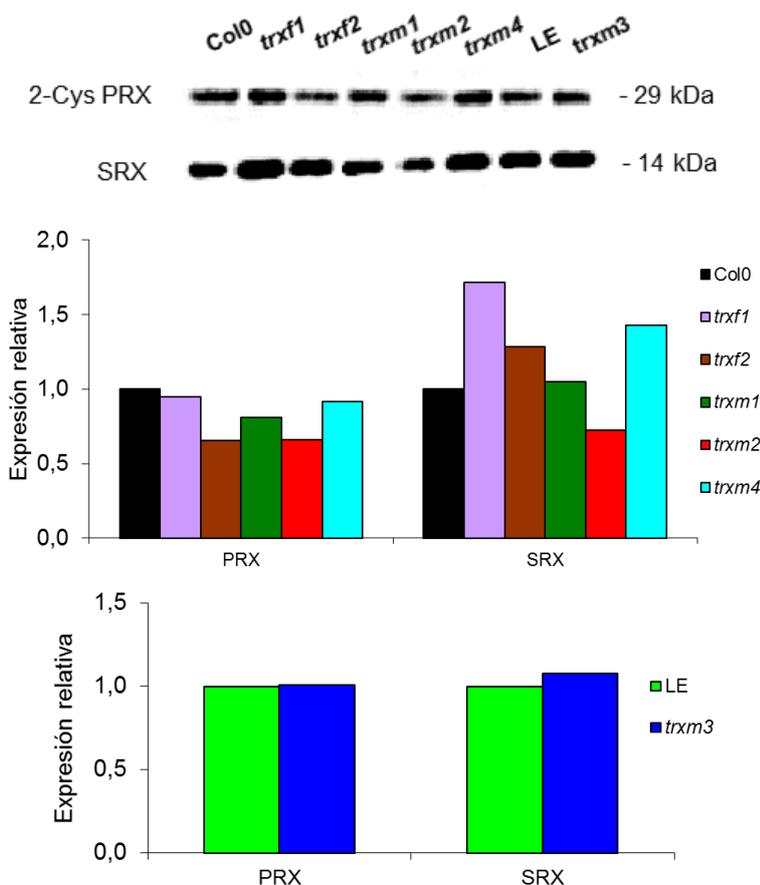


Figura 84.- Reconocimiento inmunológico y cuantificación de la señal obtenida. Se utilizaron los anticuerpos 2 Cys-PRX y SRX frente a 30 µg de extracto de roseta pertenecientes a las líneas control Col0 y LE y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*. Las plantas crecieron durante 25 días bajo condiciones de día largo.

Los niveles normales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detectados mediante tinción DAB estarían en línea con unos niveles no inducidos de 2-Cys PRX en estos mutantes. Otra enzima que podría servir como un potencial marcador de estrés oxidativo en el cloroplasto y la mitocondria (Iglesias-Baena et al., 2010) sería la SRX, encargada de revertir el estado de oxidación hasta tioles de cisternas sobre-oxidadas a ácidos sulfínicos.

La detección con el anticuerpo específico mostró un aumento de SRX en los mutantes *trxf1*, *trxf2* y *trxm4* y una disminución para el de *trxm2* (Figura 84). Este resultado sugiere la existencia de un mayor nivel de sobre-oxidación de cisteínas en las líneas con más SRX.

Los anticuerpos anti-PRX y anti-SRX fueron amablemente cedidos por el Dr. Juan José Lázaro Paniagua.

#### D.2.3.- Efecto del NaCl y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la germinación.

Semillas mutantes *trx* y silvestres fueron expuestas a concentraciones de NaCl 50 y 150 mM en el medio de crecimiento para determinar el papel de cada isoforma de TRX *f* o *m* sobre la capacidad germinativa de Arabidopsis en medios salinizados.

En la figura 85 puede observarse cómo la línea *trxm3* fue la única afectada en la germinación a una concentración de 50 mM de sal, alcanzando una tasa máxima del 65% a los 7 días, mientras que todas las semillas del silvestre LE lograron germinar a los 3 días en la cámara de cultivo.

Sin embargo, la tasa de germinación de *trxm3* en medio sin sal mostró un porcentaje similar al del medio con sal, por lo que esta concentración salina, como para el resto de las líneas mutantes, tampoco resultó afectar a la germinación de *trxm3*.

Sin embargo, el tratamiento con NaCl con una concentración tres veces superior a la anterior sí produjo un claro efecto sobre la tasa de germinación en los mutantes simples *trxf1* y *trxf2*, los cuales mostraron un retraso de 2 días en la germinación, hasta alcanzar el porcentaje ligeramente inferior al del silvestre Col0.

Además, la falta de ambas isoformas en *trxf1 trxf2* tuvo un efecto acumulativo, puesto que en los ensayos, además de un mayor retraso en germinar que el mostraron los mutantes simples, se alcanzó una tasa de germinación un 20% inferior al final del experimento.

A diferencia de las líneas *trxf*, las líneas *trxm1* y *trxm2* no presentaron diferencias significativas con respecto a la línea control; sin embargo, el mutante *trxm4* sí mostró una tasa un 15% inferior con respecto al silvestre.

Finalmente, la presencia de NaCl a las concentraciones utilizadas en estos ensayos no pareció afectar a la germinación de la línea *trxm3*, que ya mostró un defecto en el proceso germinativo en ausencia de estrés.

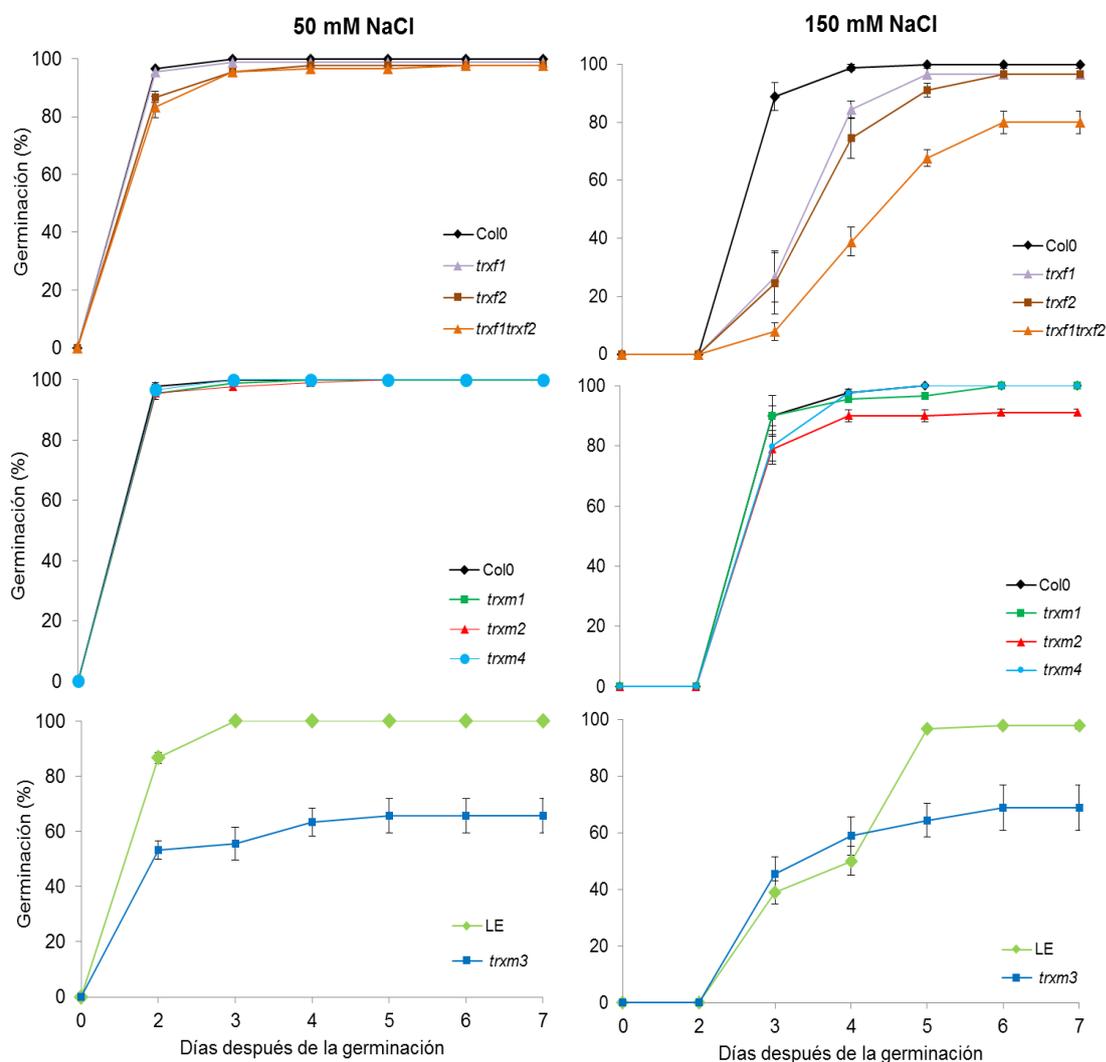


Figura 85.- Tasa de germinación (%) de las semillas de los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* en relación a las respectivas líneas silvestres *Col0* y *LE* durante 7 días en un medio de cultivo suplementado con 50 mM NaCl (izquierda) y 150 mM NaCl (derecha). Las plantas crecieron bajo condiciones de día largo (16h/8h). Cada punto es la media de 3 réplicas de 30 semillas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

A diferencia del NaCl, los tratamientos con 5 y 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 86) afectaron de manera similar a todas las líneas en estudio, incluyendo los silvestres. Como ya ocurrió con los tratamientos con sal, las diferencias observadas en las curvas de *LE* y *trxm3* no se debieron a la presencia de esta especie oxidante, ya que las curvas de germinación mantuvieron un desfase de

aproximadamente el 40%, que fue el observado en los ensayos de germinación en condiciones normales de germinación.

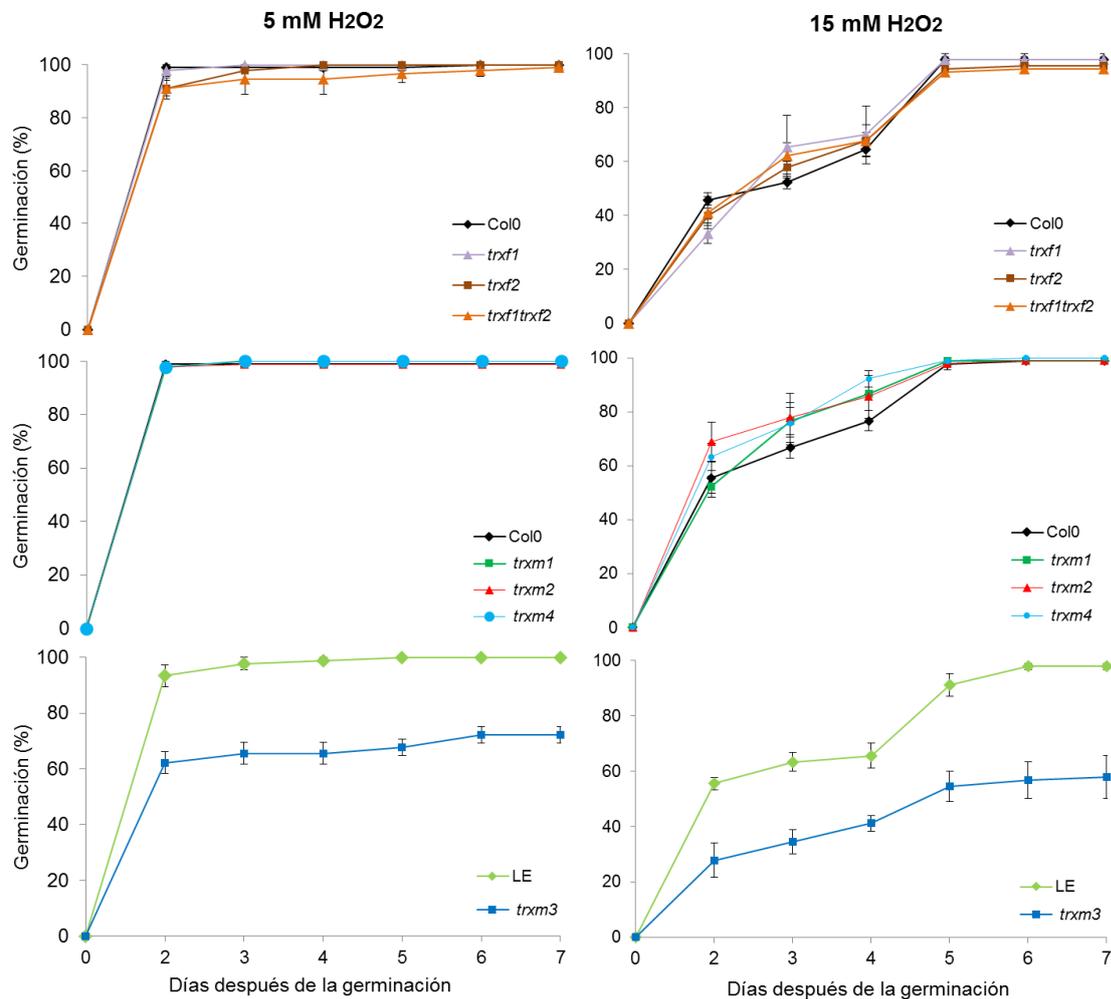


Figura 86.- Tasa de germinación (%) de las semillas de los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* en relación a las respectivas líneas silvestres *Col0* y *LE* durante 7 días en un medio de cultivo suplementado con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (izquierda) y 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (derecha). Las plantas crecieron bajo condiciones de día largo (16h/8h). Cada punto es la media de 3 réplicas de 30 semillas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

#### D.2.4.- Efecto de diferentes tipos de estrés sobre el crecimiento.

Además del estudio de cómo afectaba el estrés provocado por NaCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la germinación de los mutantes *trx*, se diseñaron experimentos para determinar la respuesta de las plántulas de 5 dpv a la exposición a distintas condiciones de estrés. Al estrés salino y oxidativo, ya analizados en germinación, se añadió el frío y el choque térmico.

De manera similar a la germinación, los mutantes *trxf1* y *trxf2* no mostraron mayor susceptibilidad que la línea silvestre al NaCl, al menos en las condiciones experimentales ensayadas. El doble mutante *trxf1 trxf2*, a diferencia de los ensayos de germinación, no se vió más afectado que el silvestre durante los ensayos (Figura 87).

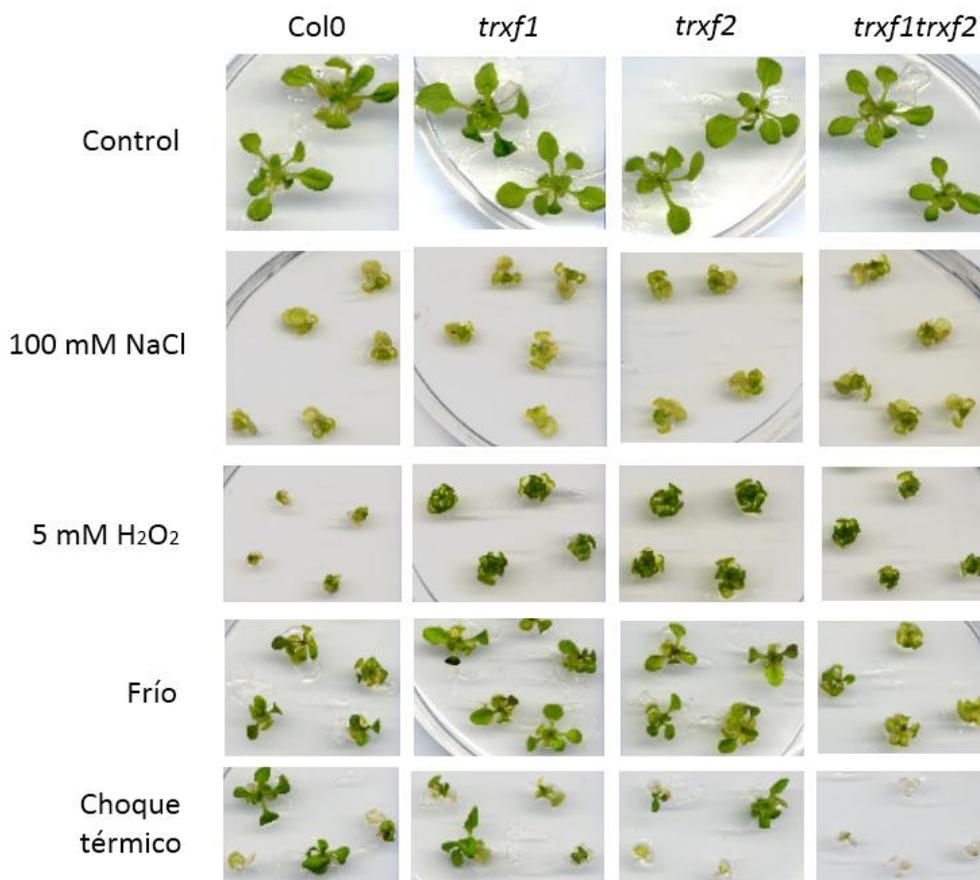


Figura 87.- Fenotipos de las líneas Col0, *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2* bajo distintos tratamientos de estrés. Las plantas crecieron durante 5 días bajo condiciones de día largo y posteriormente fueron trasplantadas a medio MS (Control); medio MS suplementado con 100mM NaCl; medio MS suplementado con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado fueron sometidas durante 10 días a 8 °C en condiciones de día largo (frío) y durante 3 horas a 37 °C (choque térmico).

Sin embargo, y sorprendentemente, tanto los mutantes simples como el doble mutante mostraron una mayor tolerancia a 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que la línea control Col0, mostrando el doble mutante *trxf1 trxf2* un menor desarrollo que las líneas parentales. El crecimiento a baja temperatura (8 °C, 10 días) pareció afectar más al mutante *trxf1 trxf2* que al resto de líneas. De manera similar, el tratamiento de choque térmico provocó daños irreversibles en el mutante doble, provocando la

muerte a las plántulas del ensayo. De los mutantes simples, la línea *trxf2* se vió más afectada por la alta temperatura (37 °C, 3 h) que la línea *trxf1*.

A diferencia de las líneas defectivas en TRXs *f*, los mutantes *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* presentaron mayor resistencia que la línea Col0 tras el tratamiento salino, pero no se apreciaron diferencias en condiciones de estrés oxidativo (Figura 88).

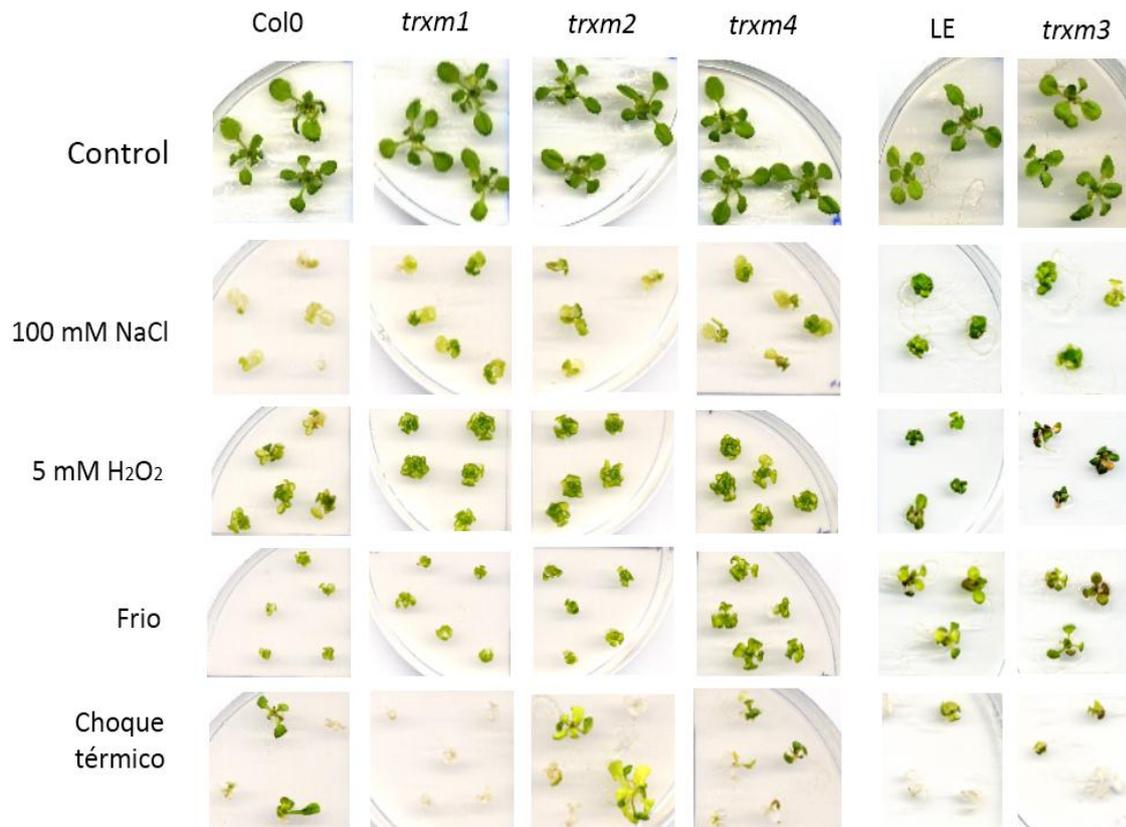


Figura 88.- Fenotipos de las líneas Col0, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, LE y *trxm3* bajo distintos tratamientos de estrés. Las plantas crecieron durante 5 días bajo condiciones de día largo y posteriormente fueron trasplantadas a medio MS (Control); medio MS suplementado con 100mM NaCl; medio MS suplementado con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado fueron sometidas durante 10 días a 8 °C en condiciones de día largo (frío) y durante 3 horas a 37 °C (choque térmico).

Las bajas temperaturas afectaron en menor grado al mutante *trxm4*, mientras que tras el choque térmico, la línea *trxm1* mostró menor capacidad de resistencia/recuperación al estrés que el resto de líneas y no sobrevivió al tratamiento. Aunque el mutante *trxm2* sí sobrevivió, desarrolló hojas cloróticas tras el mismo. Por último el mutante *trxm3* mostró un comportamiento similar al de su línea silvestre LE en todas las condiciones experimentales ensayadas.

## **E.- Respuesta a la salinidad de las TRXs *f* y *m* durante el estadio post-germinativo de Arabidopsis y guisante.**

### **E.1.- Expresión génica de AtTRXs *f* y *m* en plántulas de Arabidopsis sometidas a estrés salino.**

Se analizó la respuesta de las distintas isoformas de TRXs *f* y *m* en semillas de Arabidopsis germinadas bajo condiciones de estrés salino a lo largo de los 5 dpg (Figura 89).

Cuando las semillas fueron sometidas a concentraciones de 50 y 100 mM NaCl, los niveles de ARNm de todos los genes disminuyeron drásticamente en el primer dpd. No obstante, al tercer dpd, los niveles de expresión aumentaron, alcanzando valores similares a los de las plantas control. A los 5 dpd se observó un incremento significativo de los niveles de ARNm de todas las TRXs analizadas.

En respuesta al tratamiento de 50 mM NaCl, *AtTRXm1* presentó un incremento de 20 veces en relación al control; el resto de genes presentaron inducciones en torno a las 10 veces con respecto al control.

El incremento fue incluso mayor en plántulas cultivadas con concentraciones de NaCl de 100 mM, alcanzando para *AtTRXf2* valores de inducción de 43 veces con respecto al control y más de 20 veces para *TRXf1*, *TRXf2* y *TRXm4*, observando una relación directa entre el nivel de inducción y la concentración de NaCl utilizada en el tratamiento.

El resto de genes analizados mostraron incrementos en la acumulación de transcritos similares al otro tratamiento salino con la mitad de concentración de NaCl.

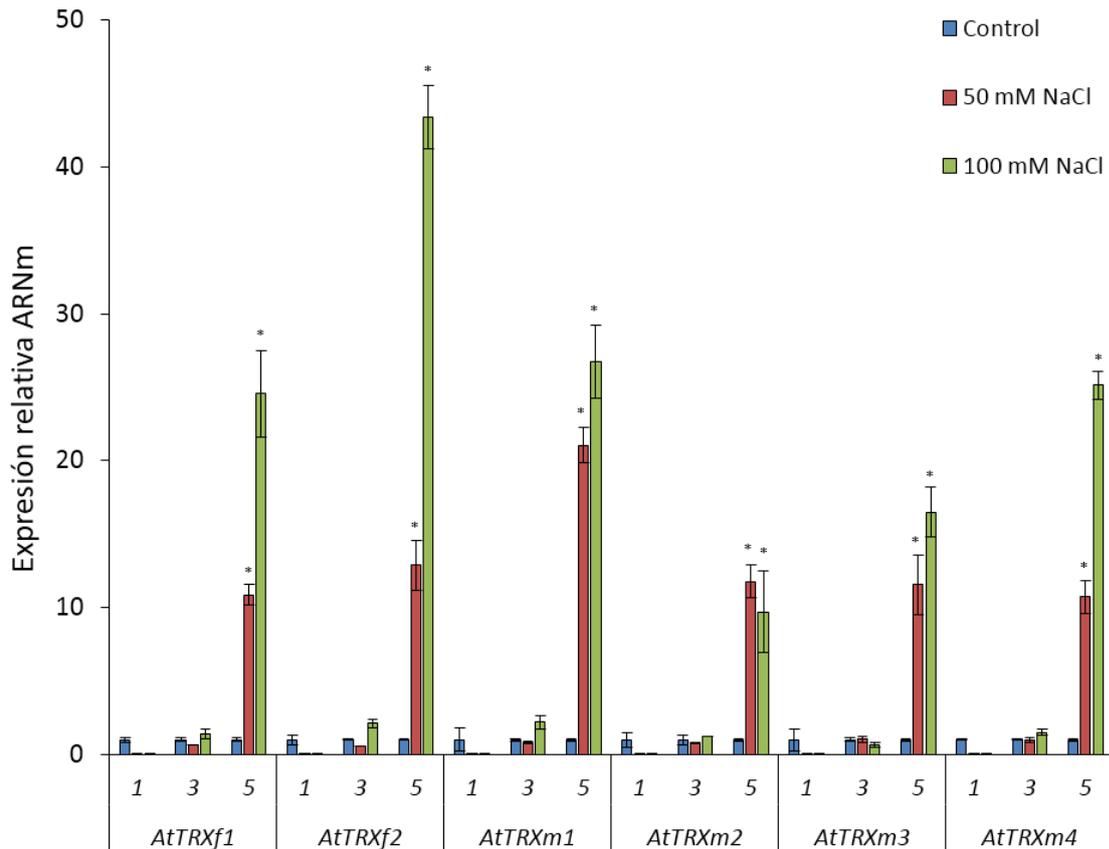


Figura 89.- Expresión génica de TRXs *f* y *m* en plántulas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro* a los 1, 3 y 5 días después de su germinación en condiciones control y en presencia de 50 y 100 mM de NaCl. Los niveles de transcripción son el resultado de 3 experimentos independientes y se normalizaron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones derivadas de dos preparaciones distintas de ADNc. Para relativizar los niveles de expresión se utilizó el valor de *AtTRXf1* en condiciones control el día 1. Se indican las diferencias significativas con respecto a la línea control (\*  $p < 0,05$  según *t*-Student).

## E.2.- Expresión de los promotores de *PsTRXf* y *PsTRXm1* en plantas etioladas.

A continuación, se investigó el comportamiento de las TRXs *m1* y *f* de guisante en órganos fotosintéticos en condiciones de oscuridad para determinar si, como ocurría en tejidos heterotróficos, su expresión no era exclusivamente dependiente de la luz. Para ello se usaron líneas de *A. thaliana* que portaban construcciones del gen reportero GUS bajo el control de los promotores de *PsTRXf* y *m1* (Barajas-López et al., 2007). Estas líneas se cultivaron en condiciones de día largo o de oscuridad para permitir la fotomorfogénesis, inducida por la luz, o bien para bloquear la diferenciación del plastidio en etioplastos, conocida como ecotomorfogénesis (Figura 90).

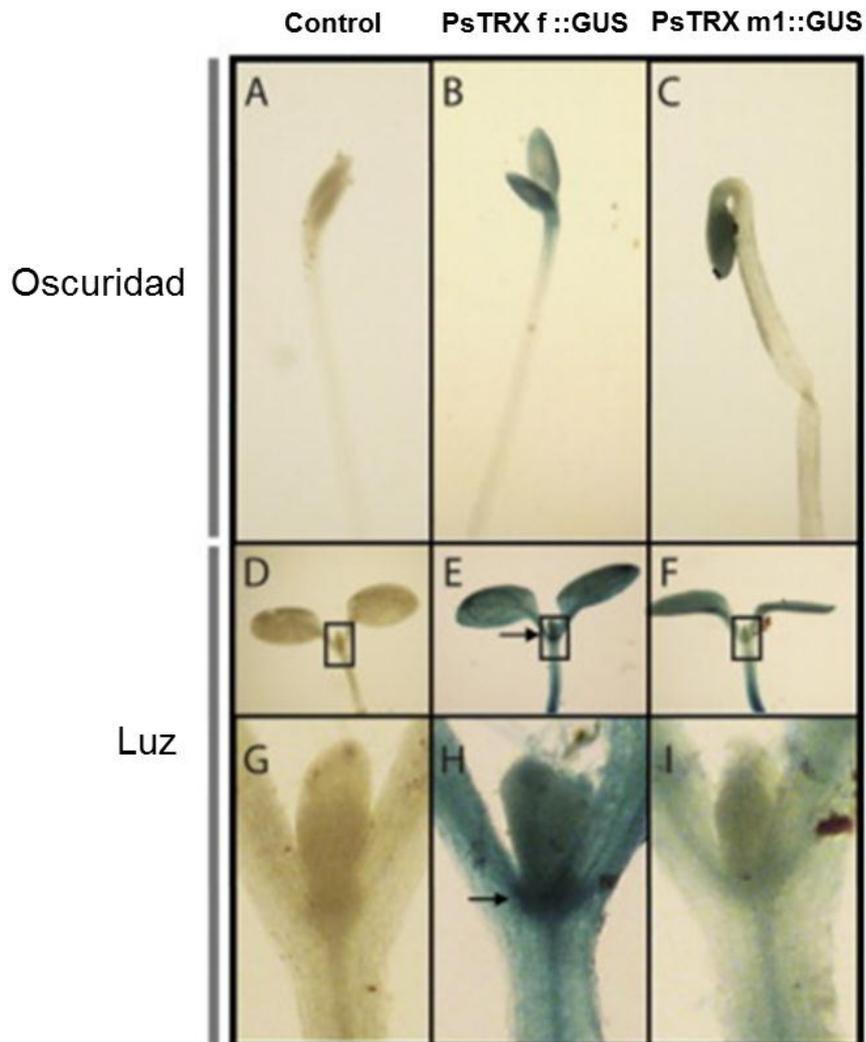


Figura 90.- Localización histoquímica en *A. thaliana* de la expresión GUS bajo el control de los promotores de las TRXs plastidiales de guisante. (A, D, G) plantas transgénicas control transformadas con vector pBI101. (B, E, H) plántulas de *A. thaliana* con la construcción *PsTRX f::GUS*. (C, F, I) plántulas de *A. thaliana* con la construcción *PsTRX m1::GUS*. Plántulas de *A. thaliana* de 7 días fueron cultivadas en presencia (D-I), o en ausencia de luz (A-C). (G, H, I) Aumento de las áreas enmarcadas en D, E y F que muestran detalles de la zona meristemática.

A los 7 días, las plántulas etioladas expresaron claramente ambos genes de TRXs en cotiledones no verdes; sin embargo, la expresión de GUS fue menos intensa que la observada en las plántulas expuestas a luz. A diferencia de en cotiledones, la coloración de los hipocotilos etiolados fue muy tenue.

Cabe destacar que la señal detectada en presencia de luz en las células meristemáticas fue mucho más evidente en el caso de *PsTRXf* que para *PsTRXm1*.

### E.3.- Búsqueda de elementos reguladores relacionados con salinidad en regiones promotoras de *PsTRXf* y *PsTRXm1*.

El estudio de los elementos de regulación génica presentes en las secuencias promotoras de *PsTRXf* y *PsTRXm1* (Barajas-López et al., 2007) se llevó a cabo con la base de datos de PLACE, al igual que con el análisis de las regiones promotoras de *A. thaliana*. Gracias a esta herramienta se identificaron 4 secuencias relacionadas con la respuesta a estrés abiótico por sal, 3 de ellas comunes a los dos genes (Figura 91).

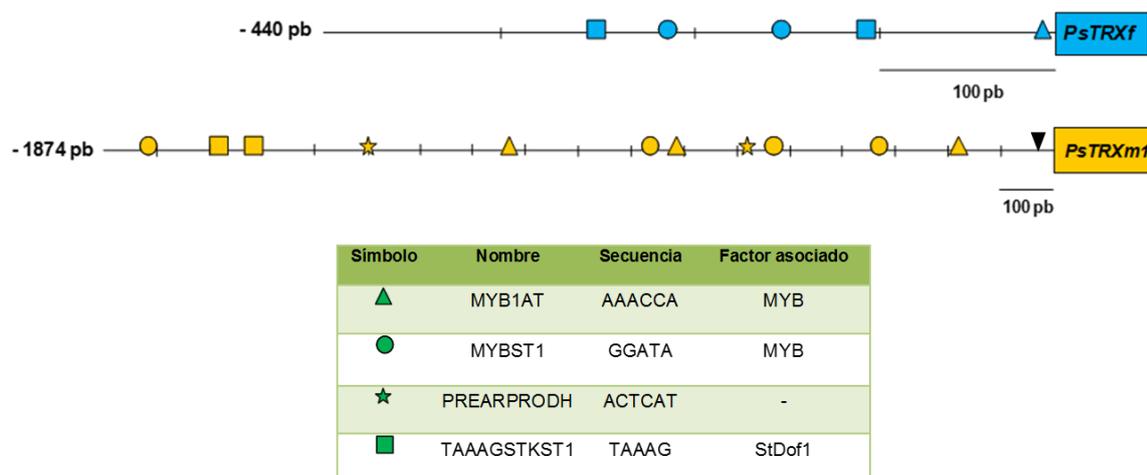


Figura 91. Localización de los elementos reguladores relacionados con estrés abiótico. Se indica la longitud de los fragmentos, en el caso de *PsTRXf* tomando como referencia el codón de inicio (ATG) de la traducción y en el caso de *PsTRXm1* el sitio de inicio de la transcripción, marcado con un triángulo invertido negro.

Se hallaron los motivos reguladores de respuesta frente a estrés salino TAAAGSTKST1, PREARPRODH y MYB1AT/MYBST1. Como ya se comentó, estas secuencias están asociadas a mecanismos de activación de sistemas de defensa como canales iónicos y las vías de respuesta celular mediadas por los factores de transcripción de la familias DOF y MYB.

### E.4.- Análisis de la expresión de *PsTRXsf* y *m* en plántulas en fase post-germinativa del desarrollo.

La cuantificación mediante RT-qPCR de la expresión de *PsTRXf*, *m1*, *m2* y de *FNR* en ápice de la raíz, raíz, cotiledón y epicotilo de plántulas de guisante en estadios iniciales del desarrollo indicó una mayor expresión en cotiledones a los 2, 3 y 5 dpi (días post-imbibición, Figura 92B).

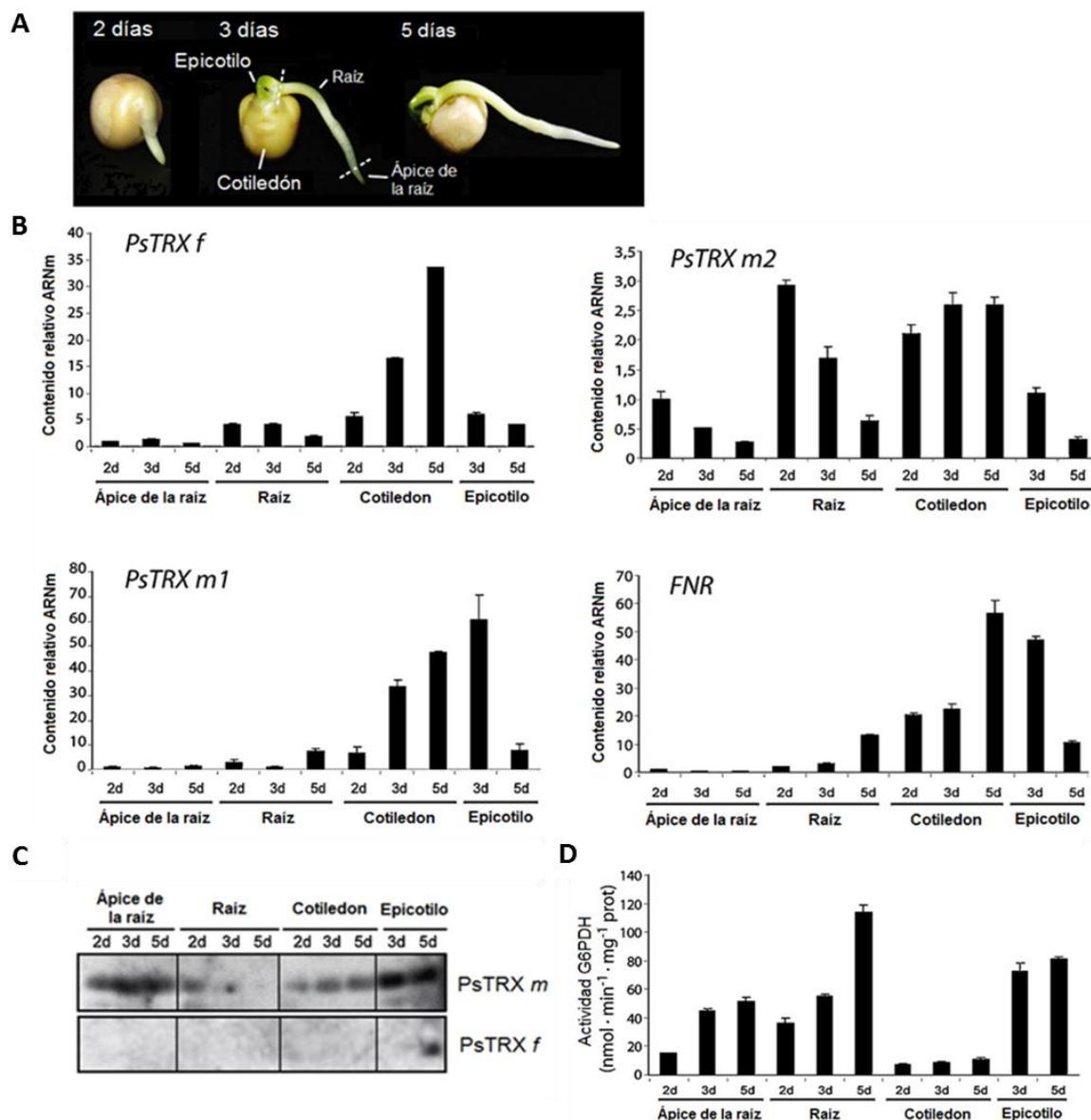


Figura 92.- Análisis de la expresión de *PsTRXf*, *m1* y *m2* y *FNR* y actividad *G6PDH* en plántulas de *P. sativum*. Las semillas se embebieron en agua y se incubaron a 22 °C en condiciones de día largo. (A) Ilustración de las plántulas de guisante en la que se indican las diferentes partes de la anatomía utilizadas para el aislamiento de ARNm y proteínas. (B) Cuantificación del contenido relativo de ARNm (teniendo en cuenta los valores determinados para el ápice de la raíz como el valor de referencia) para los genes *PsTRX f*, *m1* y *m2* y *FNR*. Cada valor es la media de tres determinaciones de ADNc, y las barras de error las desviaciones estándar. (C) Reconocimiento inmunológico de las *PsTRXs f* y *m1* en 30 µg de extractos muestreados a los 2, 3 y 5 dpi (D) Actividad *G6PDH* en diferentes partes de la plántula de guisante.

Sin embargo, *PsTRXm2* mostró una disminución de su expresión en las raíces más crecidas. Comparando el patrón de expresión de la *PsTRXf* con el de la *PsTRXm1*, se observó que ambos genes se comportaron de manera similar, con la excepción de una mayor la acumulación de ARNm de *PsTRXm1* en epicotilos de 3 dpi. Por su parte, el perfil de expresión de FNR (Newman and Gray, 1988; Yanagisawa, 2004) fue similar al mostrado por *PsTRXf* y *m1* (Figura 92B).

Para contrastar estos resultados se analizaron los niveles de TRXs mediante la técnica de *western-blotting* (Figura 92C). Dicho experimento mostró que la señal TRX *m* estaba presente en todos los órganos analizados, siendo destacable una mayor intensidad de señal de TRX *m* en el ápice de la raíz que en el resto de la raíz, un resultado opuesto a lo que se obtuvo en el análisis de acumulación de ARNm mediante RT-qPCR. A diferencia de TRX *m*, sólo pudo detectarse TRX *f* en epicotilos de 5 dpi.

El NADPH es la fuente de poder reductor de las TRXs plastidiales en órganos no fotosintéticos como las raíces o los cotiledones de guisante, por ello se comprobó la actividad de la G6PDH, enzima clave para la producción de NADPH por el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato.

Se determinó una mayor actividad G6PDH en raíz y meristemo de la raíz en plántulas de 5 dpi (Figura 92D), mientras que en cotiledones y epicotilo la actividad enzimática se mantuvo sin cambios en el intervalo de desarrollo estudiado. La actividad G6PDH en raíz de 5 dpi fue 10 y 6 veces mayor que la cuantificada en cotiledones y meristemo de la raíz a los 2 dpi, respectivamente. En el resto de muestras, con excepción de la baja actividad G6PDH de los cotiledones, la actividad G6PDH en epicotilo y ápice de la raíz presentaron valores similares.

#### **E.5.- Análisis de la expresión de PsTRXs *f* y *m* en órganos fotosintéticos y heterotróficos de plántulas de guisante en respuesta a NaCl.**

Para obtener información sobre el papel de *TRXf*, *m1* y *m2* de guisante frente a estrés abiótico, se estudió la respuesta a la salinidad embebiendo las raíces de plántulas de guisante en una solución de NaCl 50 mM durante 24 y 72 h.

Se analizó, además, la expresión de la enzima ascorbato peroxidasa citosólica (APX1), un indicador de respuesta a estrés salino. En la figura 93 se muestran los niveles de expresión génica en los órganos en crecimiento, raíces y epicotilo, de plántulas de guisante en respuesta a NaCl.

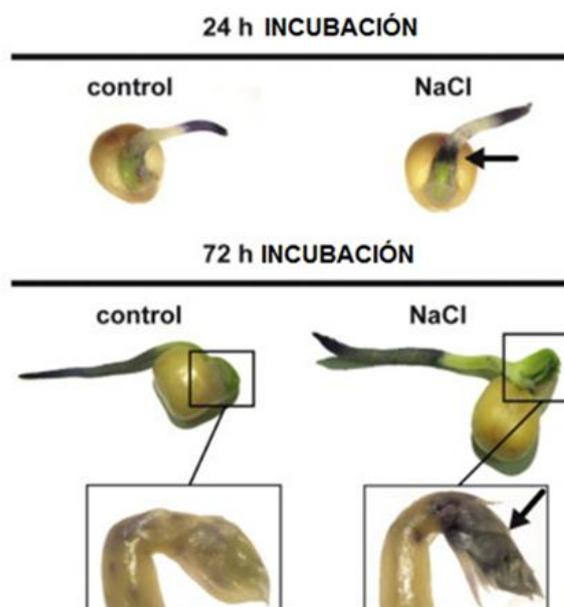


Figura 93.- Efecto del tratamiento de estrés salino 50 mM NaCl a las 24 y 72 horas respectivamente. Se señala con flechas las regiones analizadas (raíz e hipocotilo) que mostraban signos evidentes de daño por el estrés al que fue sometida la plántula.

Después de 24 h de tratamiento, *PsTRXm1* y *FNR* mostraron los niveles más altos de inducción en raíces (más de 6 veces con respecto a las muestras incubadas con H<sub>2</sub>O), seguidos por el aumento de la acumulación de transcrito de *APX1* (2 veces mayor que en las muestras sin tratar). Tanto *PsTRXf* como *PsTRXm2* no presentaron variaciones en los niveles de ARNm en estas condiciones experimentales. En las raíces expuestas 72 h a NaCl se apreció un descenso en los niveles de ARNm. La respuesta a sal en epicotilos fue sensiblemente diferente a la descrita en raíces (Figura 94).

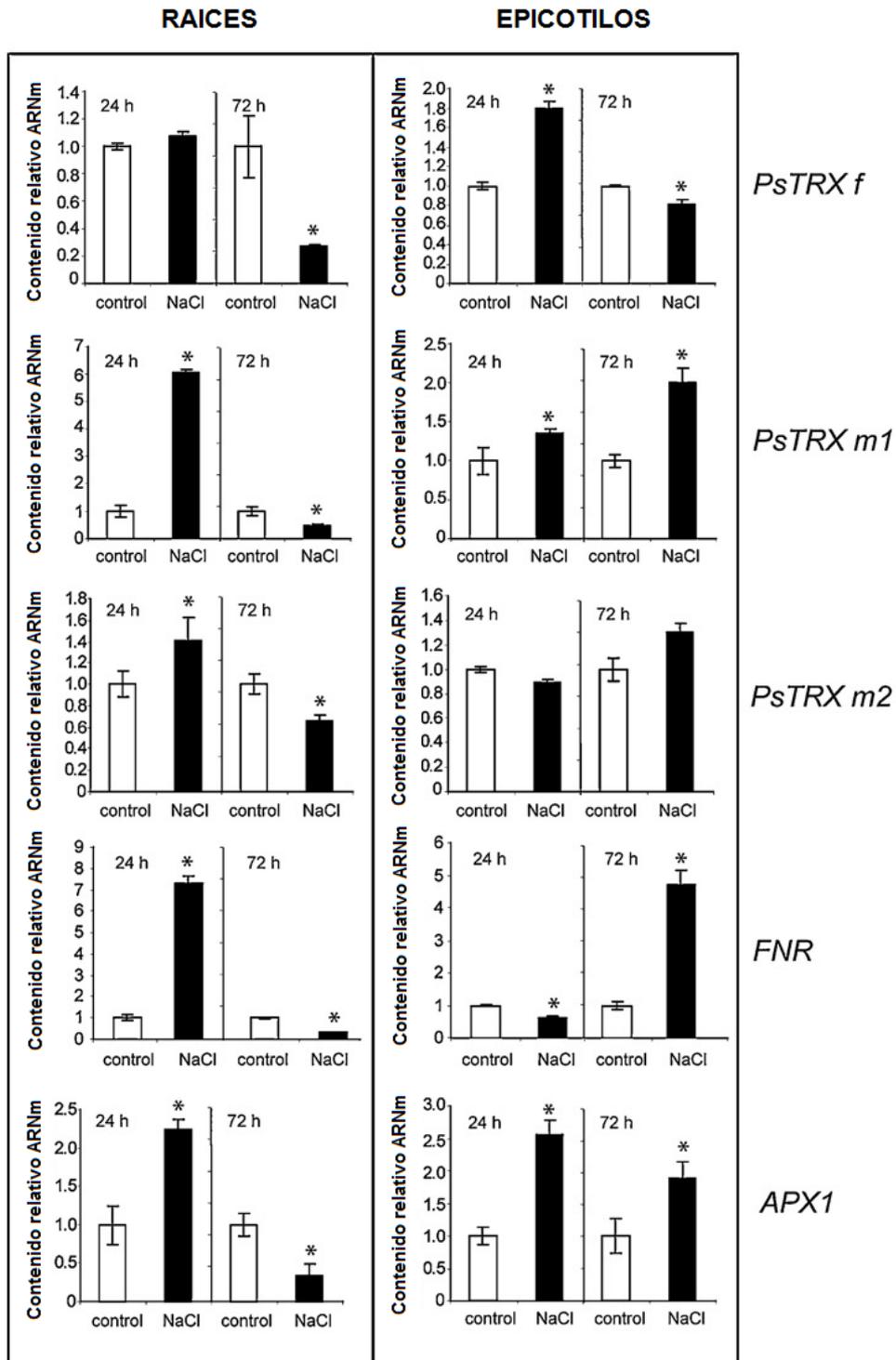


Figura 94.- Expresión génica relativa de PsTRX f, m1 y m2, FNR y APX1 en epicotilos y las raíces de las plántulas tratadas con NaCl. La acumulación de ARNm de los diferentes genes fueron analizados por qPCR. Las semillas se empapan en agua durante 48 h hasta que aparecieron las plúmulas y luego las plántulas se transfirieron a placas que contenían 50 mM de NaCl o agua (control). Epicotilos y raíces se analizaron tras 24 h y 72 h. El contenido relativo de ARNm se normalizó con respecto al obtenido en condiciones control. Cada valor es la media de tres determinaciones de ADNc, y las barras de error las desviaciones estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a la línea control (\*  $p < 0,05$  según *t*-Student).

Para *PsTRXf* se produjo una inducción a las 24 h de tratamiento, pero ningún efecto apreciable a las 72 h. Los otros genes analizados (*PsTRXm1* y *m2* y *FNR*) no registraron cambios significativos durante las primeras 24 h de ensayo. No obstante, después de 72 h se observó una inducción en la expresión de *FNR* y *PsTRXm1* de 5 y 2 veces, respectivamente. *PsTRXm2* sólo mostró un ligero incremento en el nivel de transcrito después de 72 h con la solución de NaCl.

Como podíamos esperar, *APX1* mostró un claro aumento en los niveles de ARNm en respuesta a NaCl.

La G6PDH ha sido descrita como una enzima inducida en situaciones de estrés salino (Nemoto and Sasakuma, 2000). Por este motivo, se realizaron ensayos de actividad G6PDH en extractos de plántulas incubadas en NaCl y se compararon con las plantas control en H<sub>2</sub>O.

Los ensayos enzimáticos llevados a cabo evidenciaron un incremento de un 50% en la actividad G6PDH a las 24 h de tratamiento, indicando la efectividad de las condiciones experimentales utilizadas (Figura 95); aunque, por otro lado, los valores normales de actividad se recuperaron a las 72 h. Por el contrario, en epicotilos no se apreció ninguna variación de actividad significativa.

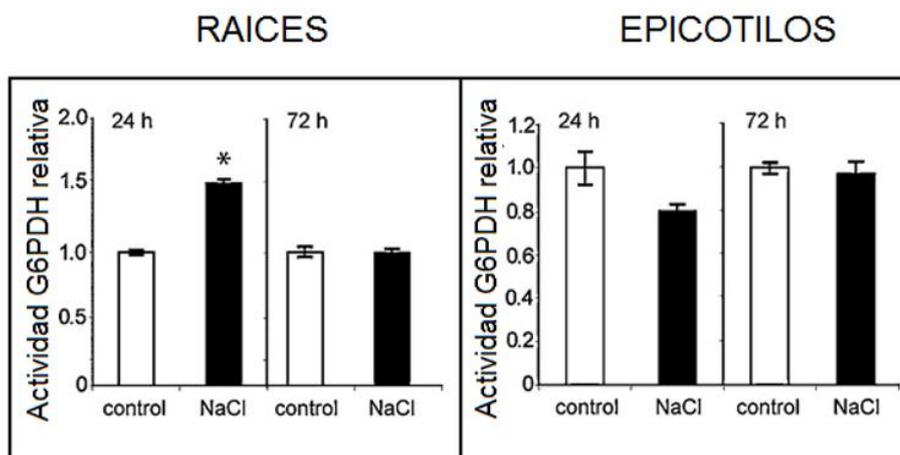


Figura 95.- Actividad G6PDH inducida en respuesta a la salinidad. Las actividades relativas se normalizaron con respecto al obtenido en condiciones control. Se indican las diferencias significativas con respecto a la línea control (\*  $p < 0,05$  según t-Student).

Para determinar el efecto del estrés por salinidad sobre los niveles de proteína se llevó a cabo un experimento de *western-blotting*, utilizando para ello anticuerpos específicos anti-PsTRX *f* y anti-PsTrx *m* (Barajas-López et al., 2007). El contenido en PsTRX *f* en epicotilo, después de 24 h de tratamiento, no varió con respecto al control, sin embargo, tras 72 h se produjo un descenso en los niveles de PsTRX *f* en los epicotilos estresados (Figura 96). Al contrario que PsTRX *f*, la isoforma PsTRX *m* se indujo en respuesta al estrés salino tanto a las 24 h como a las 72 h.

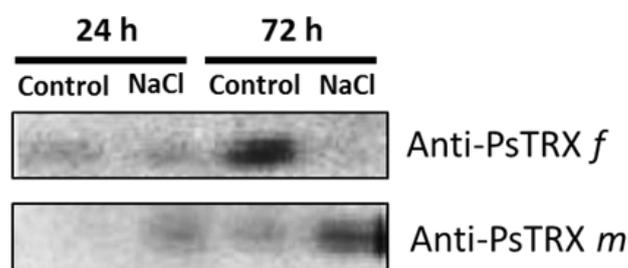


Figura 96.- Reconocimiento inmunológico de las TRXs *f* y *m1* de *P. sativum* en extractos de epicotilos pertenecientes a plantas germinadas en presencia de agua (control) y 50 mM NaCl, tras 24 y 72 h de tratamiento. En el ensayo se utilizaron 30  $\mu$ g de cada extracto previamente cuantificados.

Los niveles de PsTRX *f* y *m* en radículas estaba por debajo del umbral de detección de la técnica empleada. Aunque el anticuerpo anti-TRX *m* utilizado fue producido frente a PsTRX *m1*, debido a la similitud de secuencia entre las dos isoformas del tipo *m* de guisante no se puede descartar una reacción cruzada de estos anticuerpos con PsTRX *m2*.

#### E.6.- Crecimiento de cepas de levadura complementadas con PsTRXs en medios hipersalinos.

Las formas maduras de PsTRX *f* y *m1* fueron expresadas con el vector pFL61, de alto número de copia, en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EMY63, deficiente en la expresión de TRXs (Muller, 1991) según se había descrito en un trabajo previo (Traverso et al., 2008). Las líneas de levadura transgénicas obtenidas crecieron en medios con concentraciones de NaCl que iban desde 0,45 hasta 0,65 M. Los resultados obtenidos mostraron que ambas proteínas conferían a la cepa EMY63 la capacidad de crecer a concentraciones de NaCl de hasta 0,65 M (Figura 97).

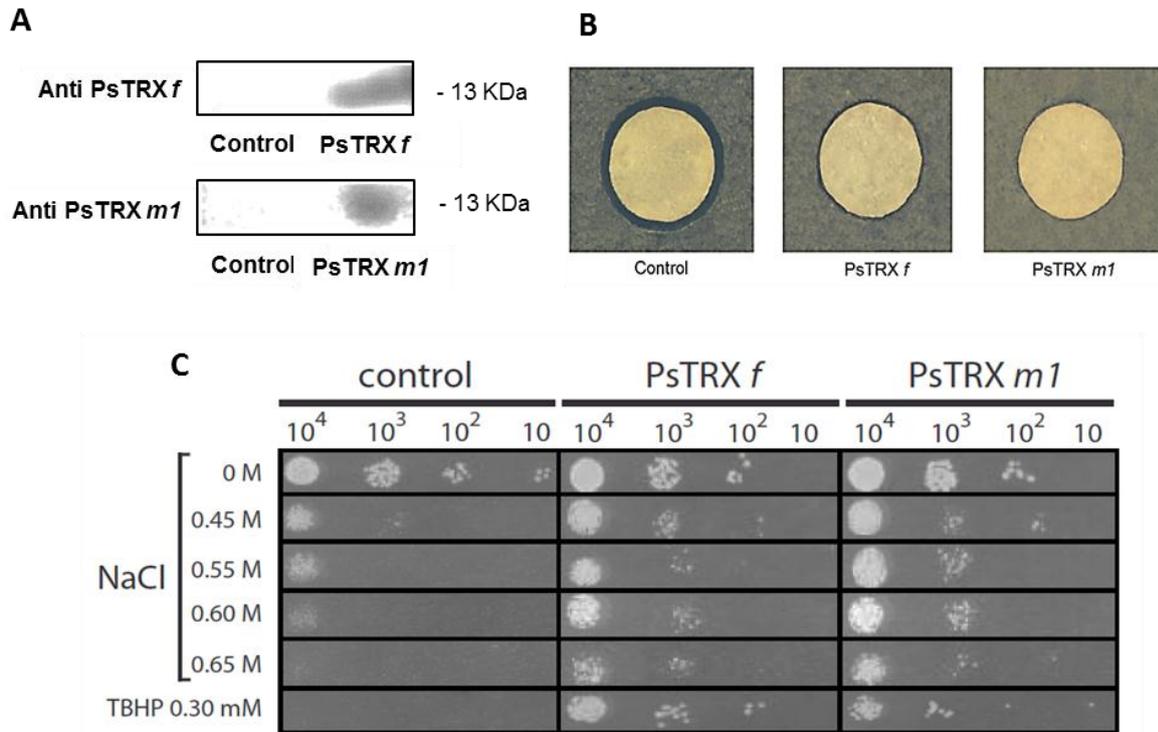


Figura 97.- Complementación de una cepa de levadura deficiente en la expresión TRX (cepa EMY63, control) en condiciones de alta concentración de NaCl. El ADNc de la PsTRX *f* y la PsTRX *m1* se clonó en el vector pFL61. (A) 30  $\mu$ g de proteína soluble de cada línea se analizó mediante western-blotting. (B) Respuesta de las cepas ante una concentración 5 M de NaCl. (C) Los cultivos de levadura se sembraron a una densidad de  $10^7$  céls./mL<sup>-1</sup> y 7  $\mu$ L de diluciones seriadas en medio sólido. Como control positivo se utilizó el agente oxidante tBHP..





## **V.- DISCUSIÓN**



## A.- Expresión y localización de las TRXs *f* y *m* en órganos fotosintéticos y no fotosintéticos.

En organismos vegetales, las TRXs de tipo *f* y *m* componen dos familias de proteínas inicialmente descritas en cloroplastos. Dentro de esta localización se las implicó con la activación de enzimas pertenecientes a las rutas metabólicas de asimilación de carbono y por ello su localización y funciones se restringieron a órganos y tejidos de la planta capaces de llevar a cabo el proceso fotosintético.

Sin embargo los trabajos realizados en los últimos 15 años han demostrado que la expresión de las TRXs *f* y *m* también se produce en órganos carentes de cloroplastos, como es el caso de cotiledones, raíces y flores de guisante (Pagano et al., 2000; Barajas-López et al., 2007; Traverso et al., 2008).

Las primeras funciones propuestas en estos órganos fueron las de intervenir en la activación de enzimas implicadas en la respuesta a estrés oxidativo y en la movilización de metabolitos de reserva durante la germinación aunque, de forma posterior, muchas otras investigaciones han caracterizado nuevas funciones putativas en órganos heterotróficos como se describió en el capítulo de Introducción y se han hecho numerosos esfuerzos en caracterizar roles específicos para cada una de sus las isoformas existentes.

Aun así, todavía es relativamente escasa la información que se tiene a este respecto pues como en el caso de otros componentes de familias multigénicas resulta complejo discernir entre especificidad y redundancia funcional. Además, algunos autores han evidenciado un cruzamiento funcional entre las TRXs y otras reductasas de grupos SH, como es el caso de las GRXs (Reichheld et al., 2007).

La presente tesis continuó en *A. thaliana* el estudio de localización y caracterización funcional de las TRXs *f* y *m* debido fundamentalmente al hecho de que su genoma está secuenciado, la mayor facilidad para obtener líneas transgénicas y por la homología secuencial existente entre sus distintas isoformas y las de otras especies vegetales como el guisante.

Con el fin de entender mejor el rol de las distintas isoformas de TRXs *f* y *m* en la fisiología de los vegetales, en primer lugar abordamos un análisis comparativo de expresión génica y cuantificación de proteína en órganos pertenecientes a diferentes estadios de desarrollo de *Arabidopsis*. Tanto heterotróficos (raíces y flores), como fotosintéticos (cotiledones hojas de roseta antes de la aparición de tallo y de forma posterior la aparición de éste, los propios tallos y silicuas).

Tras el estudio de expresión génica se comprobó como la cantidad de transcritos correspondientes a los genes *AtTRXf1/f2* y *AtTRXm1/m2/m3/m4* en distintos órganos presentaban patrones diferenciados entre tipos e isoformas.

En el caso de las TRXs de tipo *m*, a nivel global las mayores cuantificaciones de ARNm se corresponden con las pertenecientes al gen *AtTRXm1*, seguidas de las de *AtTRXm2* y *AtTRXm4*, siendo las más bajas las determinadas para *AtTRXm3*. Estos niveles se encuentran por encima de los detectados para los genes de tipo *f* en todos los órganos analizados, a excepción de los medidos en cotiledones.

Cuando analizamos los porcentajes proporcionales correspondientes a cada gen respecto a la expresión total por órgano este patrón global descrito sufre algunas modificaciones que denotan variaciones diferenciales de expresión. En cotiledones, la cuantificación obtenida del gen codificante de la TRX *f2* fue mayor que las de *AtTRXm3* y *AtTRXm4*. Además, como ya se había observado anteriormente en mediciones realizadas en plántulas (Bohrer et al., 2012), la cuantificación de *AtTRXf2* resulta más elevada en este órgano que en el resto de los analizados. Por otro lado, en raíces, flores y silicuas el porcentaje total de *AtTRXm3* es mayor que la de *AtTRXm4*.

El estudio de cuantificación de proteínas no fue posible obtenerse experimentalmente debido a que los anticuerpos policlonales disponibles, obtenidos a partir de las TRXs *f* y *m1* purificadas de guisante, generaban reacciones de inmunoreconocimiento cruzado. Por esta causa se realizó el estudio *in silico* de la cantidad de proteína presente de cada isoforma en los distintos órganos analizados por RT-qPCR. Como indicador de la fiabilidad del estudio, los resultados obtenidos están en la línea de cuantificaciones

experimentales realizadas recientemente en hoja total y fracción estomática (Okegawa and Motohashi, 2015; Yoshida et al., 2015).

Mientras que la expresión génica en cotiledones de *AtTRXf2* es mayor que *AtTRXf1*, según los datos obtenidos *in silico* la cantidad de estas proteínas presente en este órgano es inversa, siendo mayor el contenido en TRX *f1* que en TRX *f2*. Sin embargo, los niveles de expresión génica de *AtTRXsm* en cotiledones son consecuentes con los encontrados en comentada base de datos.

Para contrastar los patrones de expresión con su localización *in vivo* en los órganos se recurrió a realizar las correspondientes fusiones traduccionales de las isoformas con el gen reportero GFP, tomando además la región reguladora 1000 pb aguas arriba del inicio de transcripción.

Previamente, las secuencias de las regiones reguladoras seleccionadas fueron estudiadas mediante la aplicación informática predicativa PLACE, comprobándose que las 6 secuencias presentan elementos relacionados en la bibliografía con distintos procesos fisiológicos y localizaciones, al igual que los encontrados en guisante en este trabajo y en estudios precedentes en con este mismo organismo (Barajas-López et al., 2007). Aparecieron elementos presentes en secuencias promotoras de genes que se expresan en raíces, flores, semillas y el embrión. Y también se encontraron elementos reguladores presentes en promotores de genes asociados al metabolismo del carbono, genes regulados por luz, y genes implicados a la respuesta a estrés hídrico y salino.

El análisis localización de la señal de fluorescencia por microscopía confocal validó la funcionalidad de las distintas fusiones traduccionales estudiadas al encontrarse dentro de cloroplastos en todas las líneas GFP::TRX, una localización ampliamente constatada, confirmando que las secuencias reguladoras clonadas contienen (al menos en parte) los elementos que controlan la expresión de los genes silvestres.

La señal de fluorescencia fue registrada en órganos fotosintéticos (hojas, silicuas, cotiledones, hipocotilos y radículas) y no fotosintéticos (raíces y flores) y entre las propias líneas mutantes.

En hojas de roseta, la señal asociada a cloroplastos correspondiente a la fusión TRXf2::GFP presentó una localización en citosólica a diferencia de TRXf1::GFP. De manera homóloga en raíces f1::GFP aparece principalmente en la zona de división mientras que f2::GFP se encuentra principalmente expresada en la zona de elongación, fuera de la zona meristemática con una activa división celular. Ambos órganos podrían suponer ejemplos de compartimentación funcional de ambas proteínas tanto en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos, no antes reportada.

Extender esta conclusión para el caso de las TRXs tipo *m* resulta más complejo al tratarse de 4 isoformas, si bien aparecieron diferencias en la distribución asociada a órganos heterotróficos. Se pudo comprobar como aparecía fluorescencia asociada a los órganos correspondientes a distintos estadios embrionarios, confirmando posibles funciones en la génesis temprana de la planta. En raíces, la señal m1::GFP resulta ser periférica, todo lo contrario a las detectadas para m2::GFP, m3::GFP y m4::GFP donde estaba presente en haces vasculares. Las asociadas a TRX *m3* y TRX *m4* destacaron en las regiones meristemáticas de división celular en el ápice de la raíz primaria mientras que TRX *m2* solo fue detectada en la zona apical de raíces secundarias.

A nivel intracelular TRX *m3* y TRX *m4* presentaron un patrón periférico y puntual. A parte de asociarse a plastos no fotosintéticos, esta distribución podría corresponderse con otro tipo de orgánulos. En consonancia con esta idea, recientemente se ha reportado la interacción entre la TRX *m2* de *A. thaliana* y los canales de aniones dependientes de voltaje (VDAC3) presentes en la membrana externa mitocondrial (Zhang et al., 2015), mediante doble híbrido de levadura y ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BIFC).

## **B.- Actividad y dianas de isoformas purificadas de las TRXs *f* y *m* de Arabidopsis.**

Las formas purificadas obtenidas presentan distinta movilidad electroforética, sobre todo en el caso de la TRX *m3*, lo cual nos puede indicar de partida distintas propiedades químico-físicas para esta isoforma respecto al resto, que justificarían las diferencias mostradas en los ensayos posteriores.

Se evidenciaron 3 grupos funcionales distintos en base a su capacidad reductiva de la insulina, pero estos no se correspondían con las diferencias vistas en su capacidad de activación de una diana clásica como es la FBPasa, tanto por movilidad electroforética de sus isoformas reducidas/oxidadas, como por la activación enzimática de las isoformas propias de Arabidopsis (AtcFBP1) y guisante (PscFBP1).

Las diferencias observadas entre los experimentos comentados podrían sostener que existen diversos mecanismos de interacción con dianas para cada isoforma, los cuales estarían influenciados por agentes externos más allá de las meras diferencias químico-físicas, y que modifican la actividad de las respectivas isoformas *in vivo*.

La mayoría de las dianas para ambas isoformas identificadas en raíces e inflorescencias no son coincidentes. Esto, en consonancia con los datos diferenciales de localización GFP observados, podría indicar que después de una duplicación génica, ambas isoformas han seguido un proceso de especialización y cada proteína reduce simultáneamente dianas específicas y compartidas, curiosamente no relacionados con el metabolismo de carbono o fotosíntesis.

Es destacable además el hecho de que muchas dianas encontradas en inflorescencias no tengan puentes disulfuro funcionales para procesos de intercambio redox, sugiere que la interacción con éstas haya sido mediante otros tipos descritos, como por ejemplo tipo chaperona. Por otro lado, la detección de una gran cantidad de dianas de función desconocida hasta el momento nos lleva a proponer que esta isoforma se haya implicada en los sistemas de activación/inhibición enzimática no descritos hasta la fecha.

### **C.- Funciones fisiológicas específicas no redundantes de las distintas isoformas de TRXs *f* y *m*.**

En este trabajo fueron aisladas líneas mutantes defectivas en todas las isoformas estudiadas, incluida la defectiva en la expresión de TRX m3, a pesar de que trabajos precedentes habían informado sobre la letalidad del mutante *gat1* (Benitez-alonso et. al, 2012), este trabajo evidencia que la TRX m3 no es esencial para la viabilidad de Arabidopsis.

De los experimentos de cuantificación de transcritos correspondientes a las propias TRXs *f* y *m*, así como la TRXy1 y la NTRC, se deduce que la pérdida de función de una de isoformas no desembocan en mecanismos compensatorios que suplan la ausencia de otra isoforma mediante la inducción de otras isoformas, si no que más bien se produciría una regulación negativa del resto de las isoformas, ya sean de un tipo o de otro. Así, los mecanismos de regulación de la homeostasis redox del cloroplasto contarían con elementos de conexión, al menos, entre las isoformas *f* y *m* de las TRXs plastidiales.

A nivel fisiológico los mutantes también mostraron diferencias fenotípicas destacables respecto a las líneas control, las cuales indican la existencia de especificidades funcionales.

En primer lugar se vieron alteraciones en los porcentajes de germinación tanto en condiciones fisiológicas normales, como bajo condiciones de estrés oxidativo causado por NaCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo las más destacadas las observadas en el mutante *txm3*.

En esta misma línea experimental, los mutantes *trxf* se encontraron mayormente afectados tras la evaluación de su rendimiento cuántico, y por tanto lo estaba la integridad del PSII. La inducción observada en el reconocimiento inmunológico, en extractos de hoja de roseta, de algunas proteínas pertenecientes a dicho fotosistema, confirman esta observación. No obstante, todas las líneas mostraron fenotipos sensibles a estrés por alta luz que fue confirmada por el aumento de expresión de carotenoídes.

En el caso contrario, *txm3* presenta una disminución del cociente  $F_m/F_v$  y una represión de los comentados elementos del PSII, su fenotipo a altas intensidades de luz fue menos sensible que la línea control y la caracterización del proceso fotosintético mostró una disminución de sus valores en las curvas de fijación de C, transpiración y conductancia estomática en respuesta a luz .

Son destacables las variaciones observadas en cuanto a acumulación de almidón a lo largo del ciclo de luz, sobre todo para el caso de las línea doble mutante *trxf1 trxf2*. Como se ha comentado, la TRX *f1* es un activador reconocido de enzimas del metabolismo del almidón y este efecto en la supresión génica de

ambos genes sería esperado. Sin embargo, en el contaje de gránulos de almidón por cloroplasto, a partir de imágenes de microscopía, solo se vieron diferencias en el caso del mutante *trxm4*.

La microscopía también evidenció que las células de los haces radicales de *trxf1* presentan una mayor concentración pronunciado en el cilindro vasculares de la zona de elongación dejando menos espacio para los haces.

El análisis de los transcritos de cFBP1 mostraron que la línea *trxm4* presenta una clara inducción. Esta observación fue respaldada por estudios de *western-blotting*. En el caso de la expresión de los genes que constituyen el complejo CP12/PRK/GAPDH, la falta del gen TRX *f1* supone una pérdida de expresión de al menos dos isoformas de CP12 y de la PRK.

Fue evidente también una distinta respuesta de los mutantes frente al estrés. El estudio del comportamiento de los mutantes bajo la influencia de diferentes tipos de estreses abióticos muestra un cambio en el crecimiento a partir de 100 mM de NaCl, 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como ya se evidenció de los mayores niveles de ión superóxido encontrados en rosetas de las líneas mutantes bajo condiciones fisiológicas normales. Se suman a estos, los fenotipos sensibles vistos tras tratamientos por frío y choque térmico, lo que abre un nuevo campo de posibles funciones para estas isoformas.

La búsqueda de proteínas diferencialmente expresadas en los mutantes nos mostró un patrón diverso de alteraciones, avalando la sospecha comentada de especificidad funcional de las isoformas de TRXs *f* y *m*. Se observaron más proteínas reprimidas en el caso de los mutantes *trxf* y más proteínas activadas en los *trxm*, siendo uno de los pocos ejemplos vistos de posible división funcional no solo por isoformas sino por tipos. En relación con una posible localización mitocondrial para la TRX *m2*, dianas diferencialmente expresadas en los mutantes *trxm* se han encontrado proteínas funcionalmente implicadas con transporte mitocondrial como la subunidad TIM14-1 de la translocasa de membrana interna y la subunidad alfa de la ATP sintasa; en el metabolismo de aminoácidos, como la serina hidroximetil transferasa, la aminometil transferasa, y la glicina deshidrogenasa 2; e incluso de función desconocida como la proteína de número de identificación B3H6G1.

## D.- Distribución y rol de las TRXs *f* y *m* durante la germinación de semillas y estadios tempranos de desarrollo de la plántula.

Cuando se analizó la expresión de las TRXs *f* y *m* en *A. thaliana* durante la germinación de semillas y estadios tempranos de desarrollo de la planta bajo presencia de NaCl se comprobó que la expresión de estas se encuentra influenciada por la salinidad ambiental. Concentraciones de 50 y 100 mM NaCl provocaban represión en el primer dpq y una inducción clara y diferencial en las distintas isoformas a partir del tercer dpq. Además, esta respuesta se produce de forma diferencial según si la isoforma es de tipo *f* o *m*. Así, la expresión de *AtTRXf1* y *AtTRXf2* se incrementó notablemente en presencia en el medio de germinación de 100 mM de NaCl. Coincidentemente con este hecho, el análisis de expresión génica por órganos que mostró que estos dos genes son más abundantes en cotiledones.

La complejidad a la hora de extraer ARNm y proteína total de órganos pertenecientes a plántulas, sumada a la falta de especificidad comentada por parte de los anticuerpos de guisante frente a TRXs *f* y *m* *Arabidopsis* imposibilitó un estudio más complejo con este organismo en esta línea de investigación.

Aprovechando la proximidad filogenética entre las entre las isoformas de TRXs *f* y *m* en *A. thaliana* y guisante (Barajas-López et al., 2007) no deberían aparecer problemas para extrapolar los resultados obtenidos por analizar la expresión de estas proteínas durante estadios tempranos de desarrollo de la plántula.

La cuantificación de mRNA de las TRXs *f* y *m* y de la FNR de guisante mostró que, durante el crecimiento de las plántulas, estos transcritos son más abundantes en los cotiledones de 2-5 días de edad que en otros órganos. Esto sugiere que las TRXs plastidiales podrían tener un papel en la movilización de metabolitos de reserva (aminoácidos o azúcares) almacenados en amiloplastos, aunque solo se ha observado señal de un único tipo de TRX *m*.

En las plantas, la FNR puede localizarse en órganos fotosintéticos y heterótrofos y curiosamente, se ha informado que una escisión alternativa de los

extremos N-terminales de la FNRI y FNRII fotosintéticas de trigo afectan al punto isoeléctrico y la afinidad por la Fd heterotrófica, respectivamente (Gummadova et al., 2007). Como fue comentado en el capítulo de Introducción, algunos autores han señalado que la FNR es responsable del suministro de poder reductor a la Fd en tejidos no fotosintéticos (Balmer et al., 2006). La acumulación coordinada de ARNm correspondiente a las TRXs y la FNR observada en las muestras analizadas apoyaría esta hipótesis.

Sin embargo, el perfil de expresión de FNR en las raíces (donde la acumulación relativa correspondiente a ARNm de PsTRX *m2* es mayor) no parece ser tan importante respecto a la encontrada en los cotiledones. En base a estos datos cabe plantearse la existencia de un isoforma adicional de la FNR en guisante específica de raíz.

La acumulación de transcrito correspondiente a PsTRX*m2* es similar tanto en radículas como en los cotiledones y también se detectó al tipo *m* en los cotiledones y las raíces y más abundantemente en los ápices de dicho órgano. De hecho, es en las raíces la localización dónde más ha sido reportada la presencia de TRXs plastidiales de guisante asociadas a los tejidos vasculares en las plantas adultas (Barajas-López et al., 2007; Traverso et al., 2008).

Algunos autores han sugerido que, en comparación con el tipo *f*, las TRXs *m* muestran una función desintoxicante de ROS (Mouaheb et al., 1998; Traverso et al., 2008). Además, otros investigadores han señalado la importancia de estas especies reactivas en la formación de pelos radiculares y la diferenciación tisular en puntas de las raíces del guisante (Kranner et al., 2010) dónde curiosamente la PsTRX *m* fue claramente detectada mediante los experimentos de *western-blotting* realizados.

Para obtener una mejor comprensión de los factores que pueden desencadenar el estrés oxidativo en las plantas y por tanto inducir la expresión de TRXs plastidiales se analizó el patrón de expresión de PsTRX *f*, PsTRX *m1* y *m2* cuando las plántulas de guisante estaban sometidas a condiciones de estrés salino.

Determinados datos experimentales indican que las plántulas de guisante tratadas con NaCl sufren estrés oxidativo, entre ellos una mayor contenido de transcrito correspondiente a la APX1, una actividad G6PDHasa inducida en raíces y una mayor la acumulación de  $O_2^{\cdot-}$  en las plántulas incubadas en presencia de sal (Nemoto y Sasakuma, 2000; Davletova et al., 2005; Traverso et al., 2008). De acuerdo con este hecho, los resultados obtenidos confirman que los datos reportados por otros autores que implican a la TRX *m* en lugar de la tipo *f* en la respuesta al estrés oxidativo (Issakidis-Bourguet et al., 2001). Además se demostró que el estrés salino provoca una acumulación transcritos de PsTRX *f* y *m1*. Sin embargo, no se observó ninguna correlación entre los niveles cuantificados de ARNm y los de proteína, lo que sugiere un control post-transcripcional significativo. Este hecho ha sido descrito previamente para otros TRX en la germinación de plántulas de trigo y *M. truncatula* (Serrato et al., 2001; Montrichard et al., 2003).

En un trabajo anterior, se observó que la glucosa induce la expresión de PsTRX *f* y *m1* en discos de hojas de una manera independiente de la luz (Barajas-Lopez et al., 2012). Utilizando las líneas transgénicas previamente obtenidas de *A. thaliana* que expresan el gen reportero GUS bajo el control de los promotores de la PsTRX *f* y *m1* de guisante (Barajas-López et al., 2007), se estudió la expresión de ambos genes en plántulas etioladas con el fin de separar la influencia de la luz de la resto de los estímulos ambientales. Por el contrario, la expresión de ambas TRXs prácticamente desapareció en hipocotilos. Este es un resultado sorprendente ya que los hipocotilos son órganos no fotosintéticos y, a pesar de su naturaleza, la inducción de la luz debería tener más influencia en hipocotilos que en cotiledones (Barajas-López et al., 2007). Por otro lado, la tinción de GUS observada en presencia de luz para el caso de la línea portadora del promotor de *PsTRXf* fue más intensa a nivel del meristemo apical que para el caso de la línea portadora de *PsTRX m1*. Este dato sugirió una función específica de esta de *PsTRXf* en la división celular durante esta etapa del desarrollo de la planta.

Como a pesar del efecto de la luz sobre la expresión de PsTRX *f* y *m1* (Barajas-Lopez et al., 2011), la tinción GUS fue visible en los cotiledones desarrollados en condiciones de oscuridad, sería por tanto evidente que algunos elementos *cis*, distintos de los dependientes de la luz, interactúan con algunos

factores de transcripción expresados en cotiledones de plántulas de *A. thaliana* durante el desarrollo. Sobre la base de estos resultados se propone que algunos elementos reguladores que controlan la expresión de TRX plastidiales durante la etapa post-germinativa de los cotiledones podrían estar conservados, al menos en las familias Brassicaceae y Leguminosae. Los factores de transcripción relacionados con el metabolismo de carbono denominados DOF (Yanagisawa, 2000; Lijavetzky et al., 2003) podrían estar involucrados. De hecho, se ha demostrado una interacción proteína-DNA entre el factor de transcripción DOF7 de *P. sativum* y el cluster DOF ubicado en promotores de PsTRX *f* y *m*1 (Barajas-Lopez et al., 2012).

El análisis “*in silico*” de estas regiones promotoras, obtuvo como resultado la presencia de elementos reguladores asociados a factores de transcripción DOF y genes inducidos por estrés salinos, también encontrados en las regiones reguladoras de las TRX *f* y *m* de Arabidopsis.

El elemento TAAAGSTKST1 está relacionado con la activación de un canal iónico para  $K^+$  denominado KST1 y que se localiza en células guarda en *Solanum tuberosum* (Plesch et al., 2001). El  $K^+$  tiene una gran importancia en la respuesta a la salinidad. Una elevada concentración de iones  $Na^+$  y  $Cl^-$  en el medio, produce una interferencia en la absorción de nutrientes y otros iones (sobre todo  $K^+$  pero también  $Ca^{2+}$  y  $NO_3^-$ ), siendo la capacidad de mantener una alta relación  $K^+/Na^+$ , uno de los factores determinantes de la tolerancia celular a la salinidad es interesante encontrar este tipo de elementos en genes relacionados con tolerancia a estrés salino (Traverso et al., 2008). Con este elemento interaccionan factores de transcripción de la familia DOF concretamente la proteína StDof1.

MYB1AT y MYBST1 son elementos reguladores de respuesta a estrés hídrico a los cuales se unen factores de transcripción de la familia MYB. Un gran número de genes con estos elementos reguladores pertenecen a las acuaporinas que se encuentran en los canales específicos para agua (Baranowskij et al., 1994; Abe et al., 2003). Uno de los efectos más evidentes del estrés salino es la reducción en la capacidad de absorción de agua, causando deshidratación y poniendo de manifiesto efectos asociados al estrés hídrico. A esto hay que sumar la pérdida de turgencia provocada por la salida del agua al medio, más

concentrado, a favor del gradiente. Es comprensible que ante esta situación se induzcan genes de respuesta a déficit hídrico en los tejidos, como de respuesta al estrés salino que lo provoca.

PREARPRODH es una secuencia de 6 pb descrita en el promotor del gen de la prolina deshidrogenasa (ProDH) de *A. thaliana*, está implicada en la inducción de la expresión génica en respuesta a procesos de hiposmolaridad por deficiencia de prolina en el medio (Sato et al., 2004). Al igual que otros metabolitos orgánicos con actividad osmótica los aminoácidos como la prolina tienen un papel importante en el ajuste osmótico siendo su acumulación uno de los principales cambios bioquímicos durante la adaptación a salinidad. Se consideran solutos compatibles porque no inhiben el metabolismo celular mientras generan el potencial osmótico requerido para permitir la absorción de agua en condiciones de menor potencial hídrico. En algunos casos estos aminoácidos tienen más función protectora y/o estabilizante de membranas y enzimas que propiamente osmótica (Hasegawa et al., 2000).

La complementación de una cepa de levadura deficiente en TRX (Muller, 1991) con las formas maduras y sobreexpresadas de la PsTRX *f* o *m1* restauró la capacidad de crecimiento de las dos nuevas cepas en presencia de concentraciones altas de NaCl. De acuerdo con nuestros resultados anteriores, se supuso que sólo la expresión PsTRX *m1* podría permitir el crecimiento de la levadura en condiciones de estrés por salinidad (Traverso et al., 2008). Sorprendentemente, la expresión de PsTRX *f* también confirió un crecimiento similar en condiciones idénticas, lo que sugiere que esta isoforma cumple una función similar en levadura. A pesar de esto, los datos de inducción registrados en guisante, junto con los resultados obtenidos por otros autores, no son compatibles con la idea de considerar PsTRX *f* como una isoforma de defensa frente el estrés oxidativo.

Una explicación posible para esta resistencia a NaCl sería que las TRXs suministran equivalentes de reducción para las enzimas desintoxicantes PRXs, catalasa y la superóxido dismutasa (SOD), responsables de la eliminación de ROS (Buchanan and Balmer, 2005; Chibani et al., 2010), o que interactúan con canales

específicos de intercambio iónico que tamponan la presencia de sales en el medio intracelular.







## **VI.- CONCLUSIONES - CONCLUSIONS**



## Conclusiones.-

1. Las isoformas de TRXs *f* y *m* se encuentran localizadas tanto en órganos fotosintéticos como no fotosintéticos lo que implica que estas proteínas, a pesar de estar estrechamente relacionadas con la fotosíntesis, realizan funciones independientes a este proceso en las raíces o en los órganos reproductores.
2. Los niveles de proteínas tipo *f* se encuentran regulados por mecanismos post-transcripcionales, siendo TRX *f1* más abundante que la TRX *f2*. La TRX *m1* y *m2* son las más abundantes TRXs en todos los órganos analizados, con excepción de las flores, donde TRX *m4* representa 2/3 del total observado en las seis isoformas analizadas. Por el contrario, la TRX *m3* es la isoforma menos abundantes en los órganos excepto las raíces.
3. La búsqueda de dianas para TRX *f1* y *f2* en raíces e inflorescencias no muestra coincidencias entre ambos órganos. Después de una duplicación génica, ambas isoformas han seguido un proceso de especialización y cada proteína reduce simultáneamente dianas específicas y compartidas, curiosamente no relacionados con el metabolismo de carbono o fotosíntesis.
4. A pesar de los datos publicados, este trabajo evidencia que la TRX *m3* no es esencial para la viabilidad de Arabidopsis.
5. La TRX *m3* es un reductor de la FBPasa muy ineficiente. Las otras isoformas de TRX *m* podrían reducir parcialmente a la FBPasa y funcionalmente sustituir a TRX *f1* y *f2* en vivo.
6. Los análisis de proteómica manifiestan conjuntos de proteínas afectadas en cada línea mutante que tienen relación con la fotosíntesis. Estos cambios afectan consecuentemente a la fijación de carbono y la adaptación de las plantas a las intensidades de alta luz menos algunos pequeños fenotipos a intensidades de luz óptimas, donde los parámetros de biomasa son incluso más altos en todos los mutantes individuales excepto en *trxm4*.

7. Además de ser importantes en la regulación de la fotosíntesis y la fijación del carbono, las TRXs *f* y *m* también son actores clave en la adaptación al estrés salino en plantas de *Arabidopsis* y guisante.

## Conclusions.-

1. TRXs *f* and *m* isoforms are located both in photosynthetic as in non-photosynthetic organs, implying that these proteins, despite being closely related to photosynthetic process, carry out photosynthesis-independent functions in roots or reproductive organs.
2. Post-transcriptional mechanisms are regulating type-*f* protein levels, being TRX *f1* more abundant than TRX *f2*. TRX *m1* and *m2* are the most abundant TRXs in all organs analyzed, excepting flowers, where TRX *m4* represents 2/3 of the total displayed for the six isoforms analyzed. Conversely, TRX *m3* is the less abundant isoform in all organs except roots.
3. The search of TRX *f1* and *f2* target in roots and inflorescences displayed no coincidences between both organs. After a gene duplication, both isoforms are following a specialization process and each protein simultaneously reduces both specific as shared targets, interestingly not related to carbon metabolism or photosynthesis.
4. Despite published data, this work evidences that TRX *m3* is not essential for *Arabidopsis* viability.
5. TRX *m3* is a very inefficient as a reducer of FBPase. The other TRX *m* isoforms could partially reduce FBPase and functionally substitute to TRX *f1* and *f2* *in vivo*.
6. Proteomics analyses displayed sets of particular photosynthesis-related proteins affected in each mutant line. These changes are consequently affecting the carbon fixation and plant adaptation to high-light intensities but any small phenotype at optimal light intensities, where biomass parameters are even higher in all single mutants excepting in *trxm4*.

7. Besides being important in regulating photosynthesis and carbon fixation, TRXs *f* and *m* are also key players for the adaptation to salt stress in Arabidopsis and pea plants.





## **VII.- BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografía.-

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant cell* 15:63-78.
- Alkhalifiou F, Renard M, Frendo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, Hirasawa M, Knaff DB, Ritzenthaler C, Montrichard F. 2008. A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant physiology* 148:424-435.
- Allen RD, Bernier F, Lessard PA, Beachy RN. 1989. Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer. *The Plant cell* 1:623-631.
- Allen JF, Pfannschmidt T. 2000. Balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355:1351-1359.
- Altamura MM. 2004. *Agrobacterium rhizogenes* rolB and rolD genes: regulation and involvement in plant development. *Plant cell, tissue and organ culture* 77:89-101.
- Anderson LE, Fadowole D, Reyes BA, Carol AA. 2008. Distribution of thioredoxins f and m with respect to seven light-activated enzymes and three redox-insensitive proteins in pea leaf chloroplasts. *Plant science* 174:432-445.
- Angers-Loustau A, Rainy J, Wartiovaara K. 2007. PlasmaDNA: a free, cross-platform plasmid manipulation program for molecular biology laboratories. *BMC molecular biology* 8:77.
- Arnér ES. 1999. Superoxide production by dinitrophenyl-derivatized thioredoxin reductase—a model for the mechanism and correlation to immunostimulation by dinitrohalobenzenes. *Biofactors* 10:219-226.
- Arnér ES, Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267:6102-6109.
- Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Üstün Ş, Melzer M, Petersen K, Lein W, Börnke F. 2010. Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. *The Plant Cell Online* 22:1498-1515.
- Baier M, Dietz KJ. 1997. The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *The Plant Journal* 12:179-190.
- Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schürmann P, Buchanan BB. 2003. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:370-375.
- Balmer Y, Koller A, del Val G, Schürmann P, Buchanan BB. 2004. Proteomics uncovers proteins interacting electrostatically with thioredoxin in chloroplasts. *Photosynthesis Research* 79:275-280.
- Balmer Y, Vensel WH, Cai N, Manieri W, Schürmann P, Hurkman WJ, Buchanan BB. 2006a. A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:2988-2993.
- Balmer Y, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB. 2006b. Thioredoxin target proteins in chloroplast thylakoid membranes. *Antioxidants & redox signaling* 8:1829-1834.
- Balsera M, Goetze TA, Kovács-Bogdán E, Schürmann P, Wagner R, Buchanan BB, Soll J, Bölter B. 2009. Characterization of Tic110, a channel-forming protein at the inner envelope membrane of chloroplasts, unveils a response to Ca<sup>2+</sup> and a stromal regulatory disulfide bridge. *Journal of Biological Chemistry* 284:2603-2616.
- Ballicora MA, Frueauf JB, Fu Y, Schürmann P, Preiss J. 2000. Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 275:1315-1320.
- Barajas-Lopez J, Jesus Serrato A, Cazalis R, Meyer Y, Chueca A, Philippe Reichheld J, Sahrawy M. 2011. Circadian regulation of chloroplastic f and m thioredoxins through control of the CCA1 transcription factor. *Journal of Experimental Botany* 62:2039-2051.
- Barajas-López J, Serrato AJ, Olmedilla A, Chueca A, Sahrawy M. 2007. Localization in roots and flowers of pea chloroplastic thioredoxin f and thioredoxin m proteins reveals new roles in nonphotosynthetic organs. *Plant physiology* 145:946-960.

- Barajas-Lopez J, Tezycka J, Travaglia CN, Jesus Serrato A, Chueca A, Thormaehlen I, Geigenberger P, Sahrawy M. 2012. Expression of the chloroplast thioredoxins *f* and *m* is linked to short-term changes in the sugar and thiol status in leaves of *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany* 63:4887-4900.
- Baranowskij N, Froberg C, Prat S, Willmitzer L. 1994. A novel dna-binding protein with homology to myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *Embo Journal* 13:5383-5392.
- Bartsch S, Monnet J, Selbach K, Quigley F, Gray J, von Wettstein D, Reinbothe S, Reinbothe C. 2008. Three thioredoxin targets in the inner envelope membrane of chloroplasts function in protein import and chlorophyll metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:4933-4938.
- Becker JD, Boavida LC, Carneiro J, Haury M, Feijó JA. 2003. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant physiology* 133:713-725.
- Belin C, Bashandy T, Cela J, DELORME-HINOUX V, Riondet C, Reichheld J. 2014. A comprehensive study of thiol reduction gene expression under stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment*.
- Benhar M, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. 2008. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science (New York, NY)* 320:1050-1054.
- Benitez-Alfonso Y, Cilia M, San Roman A, Thomas C, Maule A, Hearn S, Jackson D. 2009. Control of *Arabidopsis* meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:3615-3620.
- Benitez-Alfonso Y, Jackson D. 2009. Redox homeostasis regulates plasmodesmal communication in *Arabidopsis* meristems. *Plant signaling & behavior* 4:655-659.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-1523.
- Bohrer A-S, Massot V, Innocenti G, Reichheld J-P, Issakidis-Bourguet E, Vanacker H. 2012. New insights into the reduction systems of plastidial thioredoxins point out the unique properties of thioredoxin *z* from *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 63:6315-6323.
- Bowler C, Montagu Mv, Inze D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology* 43:83-116.
- Broin M, Besse I, Rey P. 2003. Evidence for post-translational control in the expression of a gene encoding a plastidic thioredoxin during leaf development in *Solanum tuberosum* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:303-308.
- Broin M, Cuié S, Eymery F, Rey P. 2002. The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *The Plant Cell Online* 14:1417-1432.
- Buchanan B, Wolosiuk R, Crawford N, Yee B. 1978. Evidence for 3 thioredoxins in leaves. In: *Plant Physiology: Amer Soc Plant Physiologists 15501 MononA Drive, Rockville, MD 20855*. p 38-38.
- Buchanan BB. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annual Review of Plant Physiology* 31:341-374.
- Buchanan BB, Balmer Y. 2005. Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol* 56:187-220.
- Buchanan BB, Schürmann P, Wolosiuk RA, Jacquot J-P. 2005. The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. In: *Discoveries in Photosynthesis: Springer*. p 859-866.
- Bulaj G, Goldenberg DP. 2001. Mutational analysis of hydrogen bonding residues in the BPTI folding pathway. *Journal of molecular biology* 313:639-656.
- Bulaj G, Kortemme T, Goldenberg DP. 1998. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* 37:8965-8972.
- Cain P, Hall M, Schröder WP, Kieselbach T, Robinson C. 2009. A novel extended family of stromal thioredoxins. *Plant molecular biology* 70:273-281.
- Cazalis R, Chueca A, Sahrawy M, López-Gorgé J. 2004. Construction of chimeric cytosolic fructose-1, 6-bisphosphatases by insertion of a chloroplastic redox regulatory cluster. *Journal of physiology and biochemistry* 60:7-21.
- Cazalis R, Pulido P, Aussenac T, Pérez-Ruiz JM, Cejudo FJ. 2006. Cloning and characterization of three thioredoxin *h* isoforms from wheat showing differential expression in seeds. *Journal of experimental botany* 57:2165-2172.

- Chan CS, Guo L, Shih MC. 2001. Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* 46:131-141.
- Chen W, Chao G, Singh KB. 1996. The promoter of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 10:955-966.
- Chi YH, Moon JC, Park JH, Kim H-S, Zulfugarov IS, Fanata WI, Jang HH, Lee JR, Lee YM, Kim ST. 2008. Abnormal chloroplast development and growth inhibition in rice thioredoxin m *knock-down* plants. *Plant physiology* 148:808-817.
- Chibani K, Couturier J, Selles B, Jacquot J-P, Rouhier N. 2010. The chloroplastic thiol reducing systems: dual functions in the regulation of carbohydrate metabolism and regeneration of antioxidant enzymes, emphasis on the poplar redoxin equipment. *Photosynthesis research* 104:75-99.
- Chibani K, Tarrago L, Gualberto JM, Wingsle G, Rey P, Jacquot J-P, Rouhier N. 2012. Atypical thioredoxins in poplar: the glutathione-dependent thioredoxin-like 2.1 supports the activity of target enzymes possessing a single redox active cysteine. *Plant physiology* 159:592-605.
- Chibani K, Tarrago L, Schürmann P, Jacquot J-P, Rouhier N. 2011. Biochemical properties of poplar thioredoxin z. *FEBS letters* 585:1077-1081.
- Chibani K, Wingsle G, Jacquot J-P, Gelhaye E, Rouhier N. 2009. Comparative genomic study of the thioredoxin family in photosynthetic organisms with emphasis on *Populus trichocarpa*. *Molecular plant* 2:308-322.
- Chivers PT, Raines RT. 1997. General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 36:15810-15816.
- Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16:735-743.
- Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M. 2003. The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *The Journal of biological chemistry* 278:23747-23752.
- Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz K-J, Issakidis-Bourguet E. 2004. Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new y-type. *Plant physiology* 136:4088-4095.
- Courteille A, Vesa S, Sanz-Barrio R, Cazale AC, Becuwe-Linka N, Farran I, Havaux M, Rey P, Rumeau D. 2013. Thioredoxin m4 controls photosynthetic alternative electron pathways in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 161:508-520.
- Chakrabarti A, Srivastava S, Swaminathan CP, Surolia A, Varadarajan R. 1999. Thermodynamics of replacing an  $\alpha$ -helical Pro residue in the P40S mutant of *Escherichia coli* thioredoxin. *Protein Science* 8:2455-2459.
- Châtelain E, Satour P, Laugier E, Vu BL, Payet N, Rey P, Montrichard F. 2013. Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:3633-3638.
- Dai S, Schwendtmyer C, Schürmann P, Ramaswamy S, Eklund H. 2000. Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster. *Science (New York, NY)* 287:655-658.
- Daloso DM, Muller K, Obata T, Florian A, Tohge T, Bottcher A, Riondet C, Bariat L, Carrari F, Nunes-Nesi A, Buchanan BB, Reichheld JP, Araujo WL, Fernie AR. 2015. Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E1392-1400.
- Dangoor I, Peled-Zehavi H, Levitan A, Pasand O, Danon A. 2009. A small family of chloroplast atypical thioredoxins. *Plant physiology* 149:1240-1250.
- De Lamotte-Guéry F, Pruvost C, Minard P, Delsuc M-A, Miginiac-Maslow M, Schmitter J-M, Stein M, Decottignies P. 1997. Structural and functional roles of a conserved proline residue in the alpha2 helix of *Escherichia coli* thioredoxin. *Protein engineering* 10:1425-1432.
- Depuydt M, Leonard SE, Vertommen D, Denoncin K, Morsomme P, Wahni K, Messens J, Carroll KS, Collet J-F. 2009. A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science (New York, NY)* 326:1109-1111.
- Dietz K-J. 2011. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & redox signaling* 15:1129-1159.
- Dillet V, Dyson HJ, Bashford D. 1998. Calculations of Electrostatic Interactions and p K as in the Active Site of *Escherichia coli* Thioredoxin. *Biochemistry* 37:10298-10306.

- Dominguez-Solis JR, He Z, Lima A, Ting J, Buchanan BB, Luan S. 2008. A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:16386-16391.
- Donald RG, Cashmore AR. 1990. Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the Arabidopsis *rbcS-1A* promoter. *The EMBO journal* 9:1717-1726.
- Dyson HJ, Tennant LL, Holmgren A. 1991. Proton-transfer effects in the active-site region of *Escherichia coli* thioredoxin using two-dimensional proton NMR. *Biochemistry* 30:4262-4268.
- Eklund H, Cambillau C, Sjöberg B, Holmgren A, Jörnvall H, Höög J, Brändén C. 1984. Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *The EMBO journal* 3:1443.
- Eklund H, Gleason FK, Holmgren A. 1991. Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 11:13-28.
- Elmayan T, Tepfer M. 1995. Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *roID* promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic research* 4:388-396.
- Faske M, Holtgreffe S, Ocheretina O, Meister M, Backhausen JE, Scheibe R. 1995. Redox equilibria between the regulatory thiols of light/dark-modulated chloroplast enzymes and dithiothreitol: fine-tuning by metabolites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1247:135-142.
- Feng WK, Wang L, Lu Y, Wang XY. 2011. A protein oxidase catalysing disulfide bond formation is localized to the chloroplast thylakoids. *Febs Journal* 278:3419-3430.
- Fernandes PA, Ramos MJ. 2004. Theoretical insights into the mechanism for thiol/disulfide exchange. *Chemistry-A European Journal* 10:257-266.
- Ferro M, Brugière S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Moyet L, Ramus C, Miras S, Mellal M, Le Gall S, Kieffer-Jaquinod S. 2010. AT\_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* 9:1063-1084.
- Filichkin SA, Leonard JM, Monteros A, Liu PP, Nonogaki H. 2004. A novel endo-beta-mannanase gene in tomato *LeMAN5* is associated with anther and pollen development. *Plant physiology* 134:1080-1087.
- Foloppe N, Sagemark J, Nordstrand K, Berndt KD, Nilsson L. 2001. Structure, dynamics and electrostatics of the active site of glutaredoxin 3 from *Escherichia coli*: comparison with functionally related proteins. *Journal of molecular biology* 310:449-470.
- Foyer CH, Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell Online* 17:1866-1875.
- Fu M, Kang HK, Son SH, Kim SK, Nam KH. 2014. A subset of arabidopsis RAV transcription factors modulates drought and salt stress responses independent of ABA. *Plant & cell physiology* 55:1892-1904.
- Funato Y, Michiue T, Asashima M, Miki H. 2006. The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt- $\beta$ -catenin signalling through dishevelled. *Nature cell biology* 8:501-508.
- Gama F, Bréhélin C, Gelhaye E, Meyer Y, Jacquot JP, Rey P, Rouhier N. 2008. Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic Prx IIE. *Physiologia plantarum* 133:599-610.
- Garcia-Pino A, Martinez-Rodriguez S, Wahni K, Wyns L, Loris R, Messens J. 2009. Coupling of domain swapping to kinetic stability in a thioredoxin mutant. *Journal of molecular biology* 385:1590-1599.
- Geigenberger P, Kolbe A, Tiessen A. 2005. Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany* 56:1469-1479.
- Gelhaye E, Rouhier N, Gérard J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, Ohlsson P-I, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB. 2004a. A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:14545-14550.
- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot J-P. 2003. Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS letters* 555:443-448.
- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot J-P. 2004b. The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:265-271.
- Gilbert HF. 1993. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 63:69-69.

- Gleason FK. 1992. Mutation of conserved residues in *Escherichia coli* thioredoxin: effects on stability and function. *Protein Science* 1:609-616.
- Gleason FK, Lim CJ, Gerami-Nejad M, Fuchs JA. 1990. Characterization of *Escherichia coli* thioredoxins with altered active site residues. *Biochemistry* 29:3701-3709.
- Haebel PW, Goldstone D, Katzen F, Beckwith J, Metcalf P. 2002. The disulfide bond isomerase DsbC is activated by an immunoglobulin-fold thiol oxidoreductase: crystal structure of the DsbC–DsbDa complex. *The EMBO journal* 21:4774-4784.
- Hall M, Mata-Cabana A, Åkerlund HE, Florencio FJ, Schröder WP, Lindahl M, Kieselbach T. 2010. Thioredoxin targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function. *Proteomics* 10:987-1001.
- Hanke GT, Kimata-Arigo Y, Taniguchi I, Hase T. 2004. A post genomic characterization of *Arabidopsis* ferredoxins. *Plant physiology* 134:255-264.
- Hansen RE, Østergaard H, Winther JR. 2005. Increasing the reactivity of an artificial dithiol-disulfide pair through modification of the electrostatic milieu. *Biochemistry* 44:5899-5906.
- Haralampidis K, Milioni D, Rigas S, Hatzopoulos P. 2002. Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the *Arabidopsis* AtHsp90-1 gene. *Plant physiology* 129:1138-1149.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang H-S, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science (New York, NY)* 290:2110-2113.
- Harrop SJ, DeMaere MZ, Fairlie WD, Reztsova T, Valenzuela SM, Mazzanti M, Tonini R, Qiu MR, Jankova L, Warton K. 2001. Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* 276:44993-45000.
- Havaux M, Bonfils J-P, Lütz C, Niyogi KK. 2000. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the npq1 *Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant physiology* 124:273-284.
- Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373:663-664.
- Heras B, Edeling MA, Schirra HJ, Raina S, Martin JL. 2004. Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:8876-8881.
- Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:3633-3638.
- Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J. 1999. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus a two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-κB. *Journal of Biological Chemistry* 274:27891-27897.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
- Höfeld J, Minami Y, Hartl F-U. 1995. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83:589-598.
- Holmgren A. 1985. Thioredoxin. *Annual review of biochemistry* 54:237-271.
- Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of biological chemistry* 264:13963-13966.
- Holmgren A. 1995. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3:239-243.
- Holmgren A, Björnstedt M. 1995. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in enzymology* 252:199.
- Holmgren A, Söderberg B, Eklund H, Brändén C. 1975. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72:2305-2309.
- Howard TP, Fryer MJ, Singh P, Metodiev M, Lytovchenko A, Obata T, Fernie AR, Kruger NJ, Quick WP, Lloyd JC. 2011. Antisense suppression of the small chloroplast protein CP12 in tobacco alters carbon partitioning and severely restricts growth. *Plant physiology* 157:620-631.
- Huang N, Sutliff TD, Litts JC, Rodriguez RL. 1990. Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant molecular biology* 14:655-668.

- Hwang YS, Karrer EE, Thomas BR, Chen L, Rodriguez RL. 1998. Three cis-elements required for rice alpha-amylase Amy3D expression during sugar starvation. *Plant molecular biology* 36:331-341.
- Iglesias-Baena I, Barranco-Medina S, Lázaro-Payo A, López-Jaramillo FJ, Sevilla F, Lázaro J-J. 2010. Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *Journal of experimental botany* 61:1509-1521.
- Ikegami A, Yoshimura N, Motohashi K, Takahashi S, Romano PG, Hisabori T, Takamiya K-i, Masuda T. 2007. The CHL11 subunit of Arabidopsis thaliana magnesium chelatase is a target protein of the chloroplast thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 282:19282-19291.
- Issakidis-Bourguet E, Mouaheb N, Meyer Y, Miginiac-Maslow M. 2001. Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. *The Plant Journal* 25:127-135.
- Izawa T, Foster R, Nakajima M, Shimamoto K, Chua NH. 1994. The rice bZIP transcriptional activator RITA-1 is highly expressed during seed development. *The Plant cell* 6:1277-1287.
- Jacquot J-P, Rivera-Madrid R, Marinho P, Kollarova M, Le Maréchal P, Miginiac-Maslow M, Meyer Y. 1994. Arabidopsis thaliana NAPHP thioredoxin reductase: cDNA characterization and expression of the recombinant protein in Escherichia coli. *Journal of molecular biology* 235:1357-1363.
- Jacquot J-P, Vidal J, Gadal P, Schürmann P. 1978. Evidence for the existence of several enzyme-specific thioredoxins in plants. *FEBS letters* 96:243-246.
- Jacquot JP, Lopez-Jaramillo J, Chueca A, Cherfils J, Lemaire S, Chedozeau B, Miginiac-Maslow M, Decottignies P, Wolosiuk R, Lopez-Gorge J. 1995. High-level expression of recombinant pea chloroplast fructose-1, 6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. *European Journal of Biochemistry* 229:675-681.
- Jacquot JP, Vidal J, Gadal P. 1976. Identification of a protein factor involved in dithiothreitol activation of NADP malate dehydrogenase from french bean leaves. *FEBS letters* 71:223-227.
- Jaramillo JL, Chueca A, Jacquot JP, Hermoso R, Lazaro JJ, Sahrawy M, Gorge JL. 1997. High-yield expression of pea thioredoxin m and assessment of its efficiency in chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase activation. *Plant physiology* 114:1169-1175.
- Jaramillo JL, Chueca A, Shahrawy M, Hermoso R, Lazaro JJ, Prado FE, Lopez Gorge J. 1994. Cloning and sequencing of a pea cDNA fragment coding for thioredoxin m. *Plant Physiology (Rockville)* 105:1021-1022.
- Joshi CP. 1987. Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucleic Acids Res* 15:9627-9640.
- Juttner J, Olde D, Langridge P, Baumann U. 2000. Cloning and expression of a distinct subclass of plant thioredoxins. *European Journal of Biochemistry* 267:7109-7117.
- Kadokura H, Katzen F, Beckwith J. 2003. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annual review of biochemistry* 72:111-135.
- Kagawa T, Hatch M. 1977. Regulation of C 4 photosynthesis: characterization of a protein factor mediating the activation and inactivation of NADP-malate dehydrogenase. *Archives of biochemistry and biophysics* 184:290-297.
- Kamiya N, Nagasaki H, Morikami A, Sato Y, Matsuoka M. 2003. Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 35:429-441.
- Karamoko M, Cline S, Redding K, Ruiz N, Hamel PP. 2011. Lumen thiol oxidoreductase1, a disulfide bond-forming catalyst, is required for the assembly of photosystem II in Arabidopsis. *The Plant cell* 23:4462-4475.
- Kasajima I, Ide Y, Ohkama-Ohtsu N, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T. 2004. A protocol for rapid DNA extraction from Arabidopsis thaliana for PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:49-52.
- Katzen F, Beckwith J. 2000. Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell* 103:769-779.
- Kern R, Malki A, Holmgren A, Richarme G. 2003. Chaperone properties of Escherichia coli thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biochem J* 371:965-972.
- Keryer E, Collin V, Lavergne D, Lemaire S, Issakidis-Bourguet E. 2004. Characterization of Arabidopsis mutants for the variable subunit of ferredoxin: thioredoxin reductase. *Photosynthesis Research* 79:265-274.

- Kieselbach T, Schröder WP. 2003. The proteome of the chloroplast lumen of higher plants. *Photosynthesis research* 78:249-264.
- Kirchsteiger K, Ferrández J, Pascual MB, González M, Cejudo FJ. 2012. NADPH thioredoxin reductase C is localized in plastids of photosynthetic and nonphotosynthetic tissues and is involved in lateral root formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 24:1534-1548.
- Kobayashi K, Mochizuki N, Yoshimura N, Motohashi K, Hisabori T, Masuda T. 2008. Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* isoforms of the Mg-chelatase CHL1 subunit. *Photochemical & Photobiological Sciences* 7:1188-1195.
- König J, Baier M, Horling F, Kahmann U, Harris G, Schürmann P, Dietz K-J. 2002. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:5738-5743.
- König J, Muthuramalingam M, Dietz K-J. 2012. Mechanisms and dynamics in the thiol/disulfide redox regulatory network: transmitters, sensors and targets. *Current opinion in plant biology* 15:261-268.
- Kozaki A, Sasaki Y. 1999. Light-dependent changes in redox status of the plastidic acetyl-CoA carboxylase and its regulatory component. *Biochem J* 339:541-546.
- Krause G, Lundström J, Barea JL, De La Cuesta CP, Holmgren A. 1991. Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 266:9494-9500.
- Kuntz I. 1972. Protein folding. *Journal of the American Chemical Society* 94:4009-4012.
- Kushwaha HR, Singh AK, Sopory SK, Singla-Pareek SL, Pareek A. 2009. Genome wide expression analysis of CBS domain containing proteins in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh and *Oryza sativa* L. reveals their developmental and stress regulation. *BMC genomics* 10:200.
- Laemmli UK. 1970. CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4. *Nature* 227:680-&.
- Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld J-P. 2004. The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant physiology* 134:1006-1016.
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger J-M, Bonnard G, Meyer Y. 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:14144-14149.
- Lam E, Chua NH. 1989. ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in *Cab* promoters. *The Plant cell* 1:1147-1156.
- Lamkemeyer P, Laxa M, Collin V, Li W, Finkemeier I, Schöttler MA, Holtkamp V, Tognetti VB, Issakidis-Bourguet E, Kandlbinder A. 2006. Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis†. *The Plant Journal* 45:968-981.
- Landino LM, Skreslet TE, Alston JA. 2004. Cysteine oxidation of tau and microtubule-associated protein-2 by peroxynitrite modulation of microtubule assembly kinetics by the thioredoxin reductase system. *Journal of Biological Chemistry* 279:35101-35105.
- Laughner BJ, Sehnke PC, Ferl RJ. 1998. A novel nuclear member of the thioredoxin superfamily. *Plant physiology* 118:987-996.
- Laugier E, Tarrago L, Courteille A, Innocenti G, Eymery F, Rumeau D, ISSAKIDIS-BOURGUET E, Rey P. 2013. Involvement of thioredoxin y2 in the preservation of leaf methionine sulfoxide reductase capacity and growth under high light. *Plant, cell & environment* 36:670-682.
- Laurent TC, Moore EC, Reichard P. 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry* 239:3436-3444.
- Lazaro JJ, Chueca A, Lopezgor.J, Mayor F. 1974. Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloroplasts - Purification and heterogeneity. *Phytochemistry* 13:2455-2461.
- Lee J-Y, Lee D-H. 2003. Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress. *Plant physiology* 132:517-529.
- Lee M-Y, Shin K-H, Kim Y-K, Suh J-Y, Gu Y-Y, Kim M-R, Hur Y-S, Son O, Kim J-S, Song E. 2005. Induction of thioredoxin is required for nodule development to reduce reactive oxygen species levels in soybean roots. *Plant physiology* 139:1881-1889.
- Lemaire S, Collin V, Keryer E, Quesada A, Miginiac-Maslow M. 2003. Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS letters* 543:87-92.

- Lemaire SD, Guillon B, Le Maréchal P, Keryer E, Miginiac-Maslow M, Decottignies P. 2004. New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:7475-7480.
- Lemaire SD, Michelet L, Zaffagnini M, Massot V, Issakidis-Bourguet E. 2007. Thioredoxins in chloroplasts. *Current genetics* 51:343-365.
- Lemeille S, Rochaix J-D. 2010. State transitions at the crossroad of thylakoid signalling pathways. *Photosynthesis Research* 106:33-46.
- Lennartz K, Plücken H, Seidler A, Westhoff P, Bechtold N, Meierhoff K. 2001. HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome b6 complex in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 13:2539-2551.
- Lepiniec L, Hodges M, Gadal P, Crépin C. 1992. Isolation, characterization and nucleotide sequence of a full-length pea cDNA encoding thioredoxin-f. *Plant molecular biology* 18:1023-1025.
- Lepistö A, Kangasjärvi S, Luomala E-M, Brader G, Sipari N, Keränen M, Keinänen M, Rintamäki E. 2009. Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 149:1261-1276.
- Lepistö A, Pakula E, Toivola J, Krieger-Liszczay A, Vignols F, Rintamäki E. 2013. Deletion of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase results in inability to regulate starch synthesis and causes stunted growth under short-day photoperiods. *Journal of experimental botany*:ert216.
- Lepistö A, Toivola J, Nikkanen L, Rintamäki E. 2012. Retrograde signaling from functionally heterogeneous plastids. *Frontiers in plant science* 3.
- Lewin A, Crow A, Hodson C, Hederstedt L, Le Brun N. 2008. Effects of substitutions in the CXXC active-site motif of the extracytoplasmic thioredoxin ResA. *Biochem J* 414:81-91.
- Li C-W, Lee S-H, Chieh P-S, Lin C-S, Wang Y-C, Chan M-T. 2012. *Arabidopsis* root-abundant cytosolic methionine sulfoxide reductase B genes *Msrb7* and *Msrb8* are involved in tolerance to oxidative stress. *Plant and Cell Physiology* 53:1707-1719.
- Li Y, Hu Y, Zhang X, Xu H, Lescop E, Xia B, Jin C. 2007. Conformational fluctuations coupled to the thiol-disulfide transfer between thioredoxin and arsenate reductase in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 282:11078-11083.
- Lim CJ, Kim WB, Lee B-S, Lee HY, Kwon T-H, Park JM, Kwon S-Y. 2010. Silencing of SIFTR-c, the catalytic subunit of ferredoxin: thioredoxin reductase, induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tomato plants. *Biochemical and biophysical research communications* 399:750-754.
- Lindahl M, Kieselbach T. 2009. Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. *Journal of proteomics* 72:416-438.
- Lindahl M, Mata-Cabana A, Kieselbach T. 2011. The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: analysis and functional significance. *Antioxidants & redox signaling* 14:2581-2642.
- López-Calcano PE, Howard TP, Raines CA. 2014. The CP12 protein family: a thioredoxin-mediated metabolic switch? *Frontiers in plant science* 5.
- Lu W, Tang X, Huo Y, Xu R, Qi S, Huang J, Zheng C, Wu C-a. 2012. Identification and characterization of fructose 1, 6-bisphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. *Gene* 503:65-74.
- Lu Y, Wang H-R, Li H, Cui H-R, Feng Y-G, Wang X-Y. 2013. A chloroplast membrane protein LTO1/AtVKOR involving in redox regulation and ROS homeostasis. *Plant cell reports* 32:1427-1440.
- Luo T, Fan T, Liu Y, Rothbart M, Yu J, Zhou S, Grimm B, Luo M. 2012. Thioredoxin redox regulates ATPase activity of magnesium chelatase CHL1 subunit and modulates redox-mediated signaling in tetrapyrrole biosynthesis and homeostasis of reactive oxygen species in pea plants. *Plant physiology* 159:118-130.
- Lutolf M, Tirelli N, Cerritelli S, Cavalli L, Hubbell J. 2001. Systematic modulation of Michael-type reactivity of thiols through the use of charged amino acids. *Bioconjugate chemistry* 12:1051-1056.
- Marchand C, Le Maréchal P, Meyer Y, Decottignies P. 2006. Comparative proteomic approaches for the isolation of proteins interacting with thioredoxin. *Proteomics* 6:6528-6537.

- Marchand C, Le Maréchal P, Meyer Y, Miginiac-Maslow M, Issakidis-Bourguet E, Decottignies P. 2004. New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* 4:2696-2706.
- Marchand CH, Vanacker H, Collin V, Issakidis-Bourguet E, Maréchal PL, Decottignies P. 2010. Thioredoxin targets in Arabidopsis roots. *Proteomics* 10:2418-2428.
- Marri L, Zaffagnini M, Collin V, Issakidis-Bourguet E, Lemaire SD, Pupillo P, Sparla F, Miginiac-Maslow M, Trost P. 2009. Prompt and easy activation by specific thioredoxins of Calvin cycle enzymes of Arabidopsis thaliana associated in the GAPDH/CP12/PRK supramolecular complex. *Molecular Plant* 2:259-269.
- Martin H, Dean M. 1991. Identification of a thioredoxin—related protein associated with plasma membranes. *Biochemical and biophysical research communications* 175:123-128.
- Martin JL. 1995. Thioredoxin—a fold for all reasons. *Structure* 3:245-250.
- Martin MN, Tarczynski MC, Shen B, Leustek T. 2005. The role of 5'-adenylylsulfate reductase in controlling sulfate reduction in plants. *Photosynthesis Research* 86:309-323.
- McCarthy AA, Haebel PW, Törrönen A, Rybin V, Baker EN, Metcalf P. 2000. Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from Escherichia coli. *Nature Structural & Molecular Biology* 7:196-199.
- McKinney DW, Buchanan BB, Wolosiuk RA. 1978. Activation of chloroplast ATPase by reduced thioredoxin. *Phytochemistry* 17:794-795.
- Menchise V, Corbier C, Didierjean C, Saviano M, Benedetti E, Jacquot J, Aubry A. 2001. Crystal structure of the wild-type and D30A mutant thioredoxin h of Chlamydomonas reinhardtii and implications for the catalytic mechanism. *Biochem J* 359:65-75.
- Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB. 2010. A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:3900-3905.
- Menges M, Hennig L, Grussem W, Murray JA. 2002. Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 277:41987-42002.
- Messens J, Silver S. 2006. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *Journal of molecular biology* 362:1-17.
- Mestres-Ortega D, Meyer Y. 1999. The Arabidopsis thaliana genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* 240:307-316.
- Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld JP, Riondet C. 2012. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants & redox signaling* 17:1124-1160.
- Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riondet C, Vignols F, Reichheld JP. 2008. Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1783:589-600.
- Meyer Y, Vignols F, Reichheld JP. 2002. Classification of Plant Thioredoxins by Sequence Similarity and Intron Position. *Methods in enzymology* 347:394-402.
- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P. 2009. NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:9908-9913.
- Mills JD, Mitchell P. 1982. Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. Reversal of thiol modulation in the dark. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 679:75-83.
- Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB. 2009. Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *Journal of proteomics* 72:452-474.
- Montrichard F, Renard M, Alkhalfioui F, Duval FD, Macherel D. 2003. Identification and differential expression of two thioredoxin h isoforms in germinating seeds from pea. *Plant physiology* 132:1707-1715.
- Moon JC, Jang HH, Chae HB, Lee JR, Lee SY, Jung YJ, Shin MR, Lim HS, Chung WS, Yun D-J. 2006. The C-type Arabidopsis thioredoxin reductase ANTR-C acts as an electron donor to 2-Cys peroxiredoxins in chloroplasts. *Biochemical and biophysical research communications* 348:478-484.
- Moore EC, Reichard P, Thelander L. 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides V. Purification and properties of thioredoxin reductase from Escherichia coli B. *Journal of Biological Chemistry* 239:3445-3452.

- Mossner E, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R. 1998. Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein science* 7:1233-1244.
- Motohashi K, Hisabori T. 2006. HCF164 receives reducing equivalents from stromal thioredoxin across the thylakoid membrane and mediates reduction of target proteins in the thylakoid lumen. *Journal of Biological Chemistry* 281:35039-35047.
- Motohashi K, Hisabori T. 2010. CcdA is a thylakoid membrane protein required for the transfer of reducing equivalents from stroma to thylakoid lumen in the higher plant chloroplast. *Antioxidants & redox signaling* 13:1169-1176.
- Motohashi K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T. 2001. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:11224-11229.
- Muller EGD. 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs-s phase and shortens the G1 interval of the cell-cycle. *Journal of Biological Chemistry* 266:9194-9202.
- Nakamura T, Nakamura H, Hoshino T, Ueda S, Wada H, Yodoi J. 2005. Redox regulation of lung inflammation by thioredoxin. *Antioxidants & redox signaling* 7:60-71.
- Née G, Zaffagnini M, Trost P, Issakidis-Bourguet E. 2009. Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin. *FEBS letters* 583:2827-2832.
- Newman BJ, Gray JC. 1988. Characterization of a full-length cDNA clone for pea ferredoxin-NADP+ reductase. *Plant molecular biology* 10:511-520.
- Ngai N, Tsai FY, Coruzzi G. 1997. Light-induced transcriptional repression of the pea AS1 gene: identification of cis-elements and transactors. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 12:1021-1034.
- Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology* 49:249-279.
- Ogrzewalla K, Piotrowski M, Reinbothe S, Link G. 2002. The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.). *European Journal of Biochemistry* 269:3329-3337.
- O'Neill SD, Kumagai MH, Majumdar A, Huang N, Sutliff TD, Rodriguez RL. 1990. The alpha-amylase genes in *Oryza sativa*: characterization of cDNA clones and mRNA expression during seed germination. *Molecular & general genetics : MGG* 221:235-244.
- Østergaard H, Henriksen A, Hansen FG, Winther JR. 2001. Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *The EMBO journal* 20:5853-5862.
- Pagano EA, Chueca A, Lopez-Gorge J. 2000. Expression of thioredoxins f and m, and of their targets fructose-1,6-bisphosphatase and NADP-malate dehydrogenase, in pea plants grown under normal and light/temperature stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 51:1299-1307.
- Page MD, Hamel PP, Gabilly ST, Zegzouti H, Perea JV, Alonso JM, Ecker JR, Theg SM, Christensen SK, Merchant S. 2004. A homolog of prokaryotic thiol disulfide transporter CcdA is required for the assembly of the cytochrome b6f complex in *Arabidopsis* chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 279:32474-32482.
- Pan JL, Bardwell JC. 2006. The origami of thioredoxin-like folds. *Protein science* 15:2217-2227.
- Peltier J-B, Cai Y, Sun Q, Zabrouskov V, Giacomelli L, Rudella A, Ytterberg AJ, Rutschow H, van Wijk KJ. 2006. The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Molecular & Cellular Proteomics* 5:114-133.
- Pérez-Ruiz JM, Spínola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ. 2006. Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *The Plant Cell Online* 18:2356-2368.
- Pesaresi P, Hertle A, Pribil M, Schneider A, Kleine T, Leister D. 2010. Optimizing photosynthesis under fluctuating light: the role of the *Arabidopsis* STN7 kinase. *Plant signaling & behavior* 5:21-25.
- Peterson FC, Lytle BL, Sampath S, Vinarov D, Tyler E, Shahan M, Markley JL, Volkman BF. 2005. Solution structure of thioredoxin h1 from *Arabidopsis thaliana*. *Protein science* 14:2195-2200.
- Petersson UA, Kieselbach T, García-Cerdán JG, Schröder WP. 2006. The Prx Q protein of *Arabidopsis thaliana* is a member of the luminal chloroplast proteome. *FEBS letters* 580:6055-6061.

- Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, Dietz K-J, Oelmüller R. 2006. pTAC2,-6, and-12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *The Plant Cell Online* 18:176-197.
- Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B. 2001. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant Journal* 28:455-464.
- Powis G, Mustacich D, Coon A. 2000. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radical Biology and Medicine* 29:312-322.
- Pulido P, Spínola MC, Kirchsteiger K, Guinea M, Pascual MB, Sahrawy M, Sandalio LM, Dietz K-J, González M, Cejudo FJ. 2010. Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Journal of experimental botany* 61:4043-4054.
- Puthiyaveetil S, Ibrahim IM, Jeličić B, Tomašić A, Fulgosi H, Allen JF. 2010. Transcriptional control of photosynthesis genes: the evolutionarily conserved regulatory mechanism in plastid genome function. *Genome biology and evolution* 2:888-896.
- Rabino I, Mancinelli AL. 1986. Light, temperature, and anthocyanin production. *Plant physiology* 81:922-924.
- Ravi D, Muniyappa H, Das KC. 2005. Endogenous thioredoxin is required for redox cycling of anthracyclines and p53-dependent apoptosis in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 280:40084-40096.
- Rawat R, Xu ZF, Yao KM, Chye ML. 2005. Identification of cis-elements for ethylene and circadian regulation of the *Solanum melongena* gene encoding cysteine proteinase. *Plant molecular biology* 57:629-643.
- Reichheld J-P, Khafif M, Riondet C, Droux M, Bonnard G, Meyer Y. 2007. Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell Online* 19:1851-1865.
- Reichheld J-P, Mestres-Ortega D, Laloi C, Meyer Y. 2002. The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:685-690.
- Reichheld J-P, Meyer E, Khafif M, Bonnard G, Meyer Y. 2005. AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* 579:337-342.
- Reinemer P, Dirr H, Ladenstein R, Schäffer J, Gallay O, Huber R. 1991. The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *The EMBO journal* 10:1997.
- Ren B, Huang W, Åkesson B, Ladenstein R. 1997. The crystal structure of seleno-glutathione peroxidase from human plasma at 2.9 Å resolution. *Journal of molecular biology* 268:869-885.
- Renard M, Alkhaloui F, Schmitt-Keichinger C, Ritzenthaler C, Montrichard F. 2011. Identification and characterization of thioredoxin h isoforms differentially expressed in germinating seeds of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant physiology* 155:1113-1126.
- Rey P, Cuiné S, Eymery F, Garin J, Court M, Jacquot JP, Rouhier N, Broin M. 2005. Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses. *The Plant Journal* 41:31-42.
- Rey P, Pruvot G, Becuwe N, Eymery F, Rumeau D, Peltier G. 1998. A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant journal* 13:97-108.
- Rey P, Sanz-Barrio R, Innocenti G, Ksas B, Courteille A, Rumeau D, Issakidis-Bourguet E, Farrán I. 2013. Overexpression of plastidial thioredoxins f and m differentially alters photosynthetic activity and response to oxidative stress in tobacco plants. *Frontiers in plant science* 4.
- Richter AS, Peter E, Rothbart M, Schlicke H, Toivola J, Rintamäki E, Grimm B. 2013. Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. *Plant physiology* 162:63-73.
- Rieping M, Schoffl F. 1992. Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements, and HSE sequences for enhanced expression of chimaeric heat shock genes in transgenic tobacco. *Molecular & general genetics* : MGG 231:226-232.
- Rintamäki E, Martinsuo P, Pursiheimo S, Aro E-M. 2000. Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:11644-11649.

- Rivas S, Rougon-Cardoso A, Smoker M, Schauser L, Yoshioka H, Jones JD. 2004. CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *The EMBO journal* 23:2156-2165.
- Rogers HJ, Bate N, Combe J, Sullivan J, Sweetman J, Swan C, Lonsdale DM, Twell D. 2001. Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*. *Plant molecular biology* 45:577-585.
- Roos G, Foloppe N, Van Laer K, Wyns L, Nilsson L, Geerlings P, Messens J. 2009a. How thioredoxin dissociates its mixed disulfide. *PLoS computational biology* 5:e1000461.
- Roos G, Garcia-Pino A, Brosens E, Wahni K, Vandebussche G, Wyns L, Loris R, Messens J. 2007. The conserved active site proline determines the reducing power of *Staphylococcus aureus* thioredoxin. *Journal of molecular biology* 368:800-811.
- Roos G, Geerlings P, Messens J. 2009b. Enzymatic catalysis: the emerging role of conceptual density functional theory. *The Journal of Physical Chemistry B* 113:13465-13475.
- Rose GD. 1978. Prediction of chain turns in globular proteins on a hydrophobic basis. *Nature* 272:586-590.
- Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot J-P. 2004. Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 61:1266-1277.
- Sahrawy M, Hecht V, Lopez-Jaramillo J, Chueca A, Chartier Y, Meyer Y. 1996. Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *Journal of molecular evolution* 42:422-431.
- Sanz-Barrio R, Fernandez-San Millan A, Carballeda J, Corral-Martinez P, Segui-Simarro JM, Farran I. 2012. Chaperone-like properties of tobacco plastid thioredoxins *f* and *m*. *J Exp Bot* 63:365-379.
- Sanz-Barrio R, Corral-Martinez P, Ancin M, Segui-Simarro JM, Farran I. 2013. Overexpression of plastidial thioredoxin *f* leads to enhanced starch accumulation in tobacco leaves. *Plant biotechnology journal* 11:618-627.
- Sasaki Y, Kozaki A, Hatano M. 1997. Link between light and fatty acid synthesis: thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-CoA carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:11096-11101.
- Satoh R, Fujita Y, Nakashima K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology* 45:309-317.
- Scheibe R, Anderson LE. 1981. Dark modulation of NADP-dependent malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 636:58-64.
- Scheibe R, Jacquot J-P. 1983. NADP regulates the light activation of NADP-dependent malate dehydrogenase. *Planta* 157:548-553.
- Schröter Y, Steiner S, Matthäi K, Pfannschmidt T. 2010. Analysis of oligomeric protein complexes in the chloroplast sub-proteome of nucleic acid-binding proteins from mustard reveals potential redox regulators of plastid gene expression. *Proteomics* 10:2191-2204.
- Schultz LW, Chivers PT, Raines RT. 1999. The CXXC motif: crystal structure of an active-site variant of *Escherichia coli* thioredoxin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 55:1533-1538.
- Schürmann P, Buchanan BB. 2008. The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants & redox signaling* 10:1235-1274.
- Schürmann P, Maeda K, Tsugita A. 1981. Isomers in thioredoxins of spinach chloroplasts. *European Journal of Biochemistry* 116:37-45.
- Schürmann P, Wolosiuk RA, Breazeale VD, Buchanan BB. 1976. Two proteins function in the regulation of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in chloroplasts.
- Schwarz O, Schürmann P, Strotmann H. 1997. Kinetics and thioredoxin specificity of thiol modulation of the chloroplast H<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 272:16924-16927.
- Seidel T, Seefeldt B, Sauer M, Dietz K-J. 2010. In vivo analysis of the 2-Cys peroxiredoxin oligomeric state by two-step FRET. *Journal of biotechnology* 149:272-279.
- Serrato AJ, Pérez-Ruiz JM, Spínola MC, Cejudo FJ. 2004. A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 279:43821-43827.
- Seto E, Shi Y, Shenk T, Chang L, Shenk T, Courey A, Tiiian R. 1993. Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo. *Nature* 365.

- Setterdahl AT, Chivers PT, Hirasawa M, Lemaire SD, Keryer E, Miginiac-Maslow M, Kim S-K, Mason J, Jacquot J-P, Longbine CC. 2003. Effect of pH on the oxidation-reduction properties of thioredoxins. *Biochemistry* 42:14877-14884.
- Setya A, Murillo M, Leustek T. 1996. Sulfate reduction in higher plants: molecular evidence for a novel 5'-adenylylsulfate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:13383-13388.
- Shaked Ze, Szajewski RP, Whitesides GM. 1980. Rates of thiol-disulfide interchange reactions involving proteins and kinetic measurements of thiol pKa values. *Biochemistry* 19:4156-4166.
- Shimizu M, Kato H, Ogawa T, Kurachi A, Nakagawa Y, Kobayashi H. 2010. Sigma factor phosphorylation in the photosynthetic control of photosystem stoichiometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:10760-10764.
- Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 33:259-270.
- Singh AK, Bhattacharyya-Pakrasi M, Pakrasi HB. 2008. Identification of an atypical membrane protein involved in the formation of protein disulfide bonds in oxygenic photosynthetic organisms. *Journal of Biological Chemistry* 283:15762-15770.
- Shirsat A, Wilford N, Croy R, Boulter D. 1989. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Molecular & general genetics : MGG* 215:326-331.
- Sparla F, Costa A, Schiavo FL, Pupillo P, Trost P. 2006. Redox regulation of a novel plastid-targeted  $\beta$ -amylase of Arabidopsis. *Plant physiology* 141:840-850.
- Steiner S, Dietzel L, Schröter Y, Fey V, Wagner R, Pfannschmidt T. 2009. The role of phosphorylation in redox regulation of photosynthesis genes *psaA* and *psbA* during photosynthetic acclimation of mustard. *Molecular plant* 2:416-429.
- Ströher E, Dietz KJ. 2008. The dynamic thiol-disulfide redox proteome of the Arabidopsis thaliana chloroplast as revealed by differential electrophoretic mobility. *Physiologia plantarum* 133:566-583.
- Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S, Jansson C. 2003. A novel WRKY transcription factor, *SUSIBA2*, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter. *The Plant cell* 15:2076-2092.
- Tarrago L, Laugier E, Rey P. 2009. Protein-repairing methionine sulfoxide reductases in photosynthetic organisms: gene organization, reduction mechanisms, and physiological roles. *Molecular plant* 2:202-217.
- Tarrago L, Laugier E, Zaffagnini M, Marchand CH, Le Maréchal P, Lemaire SD, Rey P. 2010. Plant thioredoxin CDSP32 regenerates 1-cys methionine sulfoxide reductase B activity through the direct reduction of sulfenic acid. *Journal of Biological Chemistry* 285:14964-14972.
- Terzaghi WB, Cashmore AR. 1995. Light-Regulated Transcription. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46:445-474.
- Thormaehlen I, Ruber J, Von Roepenack-Lahaye E, Ehrlich S, Massot V, Huemmer C, Tezycka J, Issakidis-Bourguet E, Geigenberger P. 2013. Inactivation of thioredoxin f1 leads to decreased light activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and altered diurnal starch turnover in leaves of Arabidopsis plants. *Plant, cell & environment* 36:16-29.
- Thum KE, Kim M, Morishige DT, Eibl C, Koop HU, Mullet JE. 2001. Analysis of barley chloroplast *psbD* light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco. *Plant molecular biology* 47:353-366.
- Toivola J, Nikkanen L, Dahlström KM, Salminen TA, Lepistö A. 2013. Overexpression of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase in Arabidopsis enhances leaf growth and elucidates in vivo function of reductase and thioredoxin domains. *Frontiers in plant science* 4.
- Traverso JA, Vignols F, Cazalis R, Pulido A, Sahrawy M, Cejudo FJ, Meyer Y, Chueca A. 2007. *PsTRXh1* and *PsTRXh2* are both pea h-type thioredoxins with antagonistic behavior in redox imbalances. *Plant physiology* 143:300-311.
- Traverso JA, Vignols F, Cazalis R, Serrato AJ, Pulido P, Sahrawy M, Meyer Y, Cejudo FJ, Chueca A. 2008. Immunocytochemical localization of *Pisum sativum* TRXs f and m in non-photosynthetic tissues. *Journal of Experimental Botany* 59:1267-1277.

- Valerio C, Costa A, Marri L, Issakidis-Bourguet E, Pupillo P, Trost P, Sparla F. 2011. Thioredoxin-regulated  $\beta$ -amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. *Journal of experimental botany* 62:545-555.
- Vidal J, Jacquot J, Gadal P, Vidal D. 1978. Influence of protein factors on the activation of NADP-malate dehydrogenase by dithiothreitol [*Phaseolus vulgaris*]. *Physiologia Plantarum*.
- Vieira DSC, Laugier E, Tarrago L, Massot V, Issakidis-Bourguet E, Rouhier N, Rey P. 2007. Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of *Arabidopsis* plastidial methionine sulfoxide reductases B. *FEBS letters* 581:4371-4376.
- Vieira DSC, Rey P. 2006. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in plant science* 11:329-334.
- Vieweg MF, Fruhling M, Quandt HJ, Heim U, Baumlein H, Puhler A, Kuster H, Andreas MP. 2004. The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene VfLb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 17:62-69.
- Villain P, Mache R, Zhou DX. 1996. The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *The Journal of biological chemistry* 271:32593-32598.
- Voss I, Koelmann M, Wojtera J, Holtgreffe S, Kitzmann C, Backhausen JE, Scheibe R. 2008. *Knock-out* of major leaf ferredoxin reveals new redox-regulatory adaptations in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum* 133:584-598.
- Wakao S, Benning C. 2005. Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 41:243-256.
- Wang ZY, Kenigsbuch D, Sun L, Harel E, Ong MS, Tobin EM. 1997. A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* Lhcb gene. *The Plant cell* 9:491-507.
- Wang M, Weiss M, Simonovic M, Haertinger G, Schrimpf SP, Hengartner MO, von Mering C. 2012. PaxDb, a Database of Protein Abundance Averages Across All Three Domains of Life. *Molecular & Cellular Proteomics* 11:492-500.
- Wang P, Liu J, Liu B, Da Q, Feng D, Su J, Zhang Y, Wang J, Wang H-B. 2014. Ferredoxin: thioredoxin reductase is required for proper chloroplast development and is involved in the regulation of plastid gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant* 7:1586-1590.
- Wang P, Liu J, Liu B, Feng D, Da Q, Shu S, Su J, Zhang Y, Wang J, Wang H-B. 2013. Evidence for a role of chloroplastic m-type thioredoxins in the biogenesis of photosystem II in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 163:1710-1728.
- Watkinson JI, Hendricks L, Sioson AA, Heath LS, Bohnert HJ, Grene R. 2008. Tuber development phenotypes in adapted and acclimated, drought-stressed *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* have distinct expression profiles of genes associated with carbon metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:34-45.
- Wedel N, Soll J, Paap BK. 1997. CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:10479-10484.
- Weigel D, Glazebrook J. 2002. *Arabidopsis: A laboratory manual*.
- Wenderoth I, Scheibe R, von Schaewen A. 1997. Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 272:26985-26990.
- Wimmelbacher M, Börnke F. 2014. Redox activity of thioredoxin z and fructokinase-like protein 1 is dispensable for autotrophic growth of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 65:2405-2413.
- Witte S, Villalba M, Bi K, Liu Y, Isakov N, Altman A. 2000. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF- $\kappa$ B pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *Journal of Biological Chemistry* 275:1902-1909.
- Wolosiuk RA, Buchanan BB. 1977. Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts.
- Wolosiuk RA, Buchanan BB. 1978. Activation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Plant physiology* 61:669-671.
- Wolosiuk RA, Buchanan BB, Crawford NA. 1977. Regulation of NADP-malate dehydrogenase by the light-actuated ferredoxin/thioredoxin system of chloroplasts. *FEBS letters* 81:253-258.
- Wolosiuk RA, Crawford NA, Yee BC, Buchanan BB. 1979. Isolation of three thioredoxins from spinach leaves. *Journal of Biological Chemistry* 254:1627-1632.

- Wouters M, George R, Haworth N. 2007. "Forbidden" disulfides: their role as redox switches. *Current protein and peptide science* 8:484-495.
- Xia B, Vlamis-Gardikas A, Holmgren A, Wright PE, Dyson HJ. 2001. Solution structure of *Escherichia coli* glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian glutathione-S-transferases. *Journal of molecular biology* 310:907-918.
- Xu S-Z, Sukumar P, Zeng F, Li J, Jairaman A, English A, Naylor J, Ciurtin C, Majeed Y, Milligan CJ. 2008. TRPC channel activation by extracellular thioredoxin. *Nature* 451:69-72.
- Xu X, Schürmann P, Chung J-S, Hass MA, Kim S-K, Hirasawa M, Tripathy JN, Knaff DB, Ubbink M. 2009. Ternary protein complex of ferredoxin, ferredoxin: thioredoxin reductase, and thioredoxin studied by paramagnetic NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 131:17576-17582.
- Yanagisawa S, Schmidt RJ. 1999. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 17:209-214.
- Yanagisawa S. 2000. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 21:281-288.
- Yanagisawa S. 2004. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant and Cell Physiology* 45:386-391.
- Yoo KS, Ok SH, Jeong BC, Jung KW, Cui MH, Hyung S, Lee MR, Song HK, Shin JS. 2011. Single cystathionine beta-synthase domain-containing proteins modulate development by regulating the thioredoxin system in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 23:3577-3594.
- Yoshida K, Hara S, Hisabori T. 2015. Thioredoxin Selectivity for Thiol-Based Redox Regulation of Target Proteins in Chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry:jbc*. M115. 647545.
- Yoshida K, Noguchi K, Motohashi K, Hisabori T. 2013. Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria. *Plant & cell physiology* 54:875-892.
- Zhang N, Portis AR. 1999. Mechanism of light regulation of RUBISCO: a specific role for the larger RUBISCO activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:9438-9443.







## **VIII.- APÉNDICES**



## A.- Contenido suplementario.

**Promotor *AtTRXF1***

5' ACAAGAACCACTGTCTCCGCCTGAGATCCATgaccgga**gata**tcctaac -857  
 taagttagttg**agaaatccaa**ac**gaaaaa**aatgaagaga**agaaaaaaag**c -807  
**aaaagaaag****aaaag**tatagtttggcgggtggagtacgatttaggac**aaaga** -757  
 agaagaaga**agaaaaa**ttggtactttccaaataaaa**aaag**tattttaatca -707  
 ttaactaaacaacattttgaaattaatttaagactggct**agaaa**attatg -657  
 tactatataataagattcca**tgact**acaaaaaaaaaactaattaaatt -607  
 caagattgtaataattatttta**aaagaaa**actgaaataactgctagaat**ta** -557  
**cacttttgg**cagctgtaaatttttcaacttgataattcattttttcac -457  
 atgaatatgcattgtcacattattaggctcatttttaacatttttttacc -407  
 gtctaattgtagattt**taacaaa**caacaaaaatcgactctagat**gataa**t -357  
 gagtaat**gataa**aatcatcagttgtcataaattgtaggattcaaaactgt -307  
 ttttgatcacaatatgagagttttcctta**gata**caaaactagtaatcac -257  
 tgaactat**catgcatg**ttggttggatattttgtatttttagtctaaaatagtt -207  
 aaatttatggaaaata**aaag**aattcatgtttgtctcatcattttgagggga -157  
 ccgaaccgtaatttcgcagta**agaaa**cataaatatcaatcttaattcctc -107  
 aagaattctacacctcccgttccatctatcacgaaaacaataattacag -57  
 taagtacccccgaatatccttgttcatccgaagcaattcg**ggata**atc -7  
 cgtcttttt**ctctt**taa**aatcca**at**taacataa**ataaa**tatt**tgctcag +44  
 tccgtt**g**agac**ctcacacac**actctctctctgatcattcaacttttcgaa +94  
 attttgcttcatcgtcttcgctatcgtctctctgttgaattcctcaaa**ca** +98  
**ATG** 3'

**Promotor *AtTRXF2***

5' CGCTGCAACAGAGTCGGTACTCCCGACTAAAACCTCGAAACTTGGCATCG -866  
 TTGTTGATGGAAGGA**AGAAA**CTTATGGAGCAAGAGAACTGCAATT**ACTTT** -816  
**GGAA****ACGT**CCTCTCAGTTCCATTTGGAGAGCGGAGAATCGA**TGACT**TGAT -766  
 CCACAAGCCATTGTCTTGG**GTGA**CAGACGAGGTTTACAAGTTACTGGAGA -716  
 GTACAATGACC**AAAG**ACCATTCTTGAACTTGATCGATTGGGTTGAGACT -666  
 AGCCGTCC**GATA**CCAGTTATATCAAGGATCTACAGTACAGGATCCAACGA -616  
 TGGACCCGCTTTTCGTTGTTTCGTCTGG**AAAG**AGTTTTCCAGTGGCCCGGA -566  
 TTGATTTCCGGTGGGGCTCGCCTGTTTTTGGATCGTACCAT**CTCCAC**CC -516  
 GGGAGCAGAGCTGTT**ACGT**AATGACAATGCCGAGTCCGGTGGAAAACGG -466  
 TGGCTCCGGAGATTGGACGGTTTACTTGCATCTTACG**AAAG**GACAGTTGA -416  
 GGTTTATTGAACAAGAGGCTTCTCATGTGTTTAATCCTGTTGACAACGAC -366

TATCTCAAGATT TAAag cattatcaa acttttggtt atatt attatgcaaa -316  
 taaaggcttatataaatttggcttttatagttgtaaatttcagtttaaga -266  
 tcaat att ttgatttaagttt aaaccaaa agaaa atgagtgtgcagattg -216  
 ctaatggtaatcgactaatcg tcaattcttggccttacattgtgggggta -166  
 tgatcgctattttacactcc gataa attctgaacctcgcgctccatcgaacc -116  
 cgaaaatacgt aaacatccccaaatgtcttcttcttctcg t atccat ttg -66  
 aggtattattgacctcacggta agaaa atctacaat att tcacggataa -16  
 cgaaaacaacactcg aattaaa atttggaaatca aaag tctcccaggttc +35  
 ctttg aaagat cacactactgtttttggactcgagcttcttcttcaaca +75  
**ATG** 3' +78

**Promotor *AtTRXm1***

5' Gtgata gttgtcacacaagtagaagtattataacctcactataacattta -752  
 agagctcaaaacatcaagtc agaaacca ctggcacatagcaccacatacgt -702  
 taacca tagctcaaatatctaacttaggttactagtttgaaacacaaaaat -652  
 taca aaacca gattcatagttat ccaat agaaag cactaaac aatccaag -602  
 cataaaacgattg aaag gaaacaagcaacgaggtttcattatcat gata g -552  
 tcatcggcattttacCTGTAAC TTGCCACCATTACCACCAAATCTATCGG -502  
 AG AATCCAA TTTGCACTCCAGAACTTTCAAATCATCCA CAATCTGTTTGA -452  
 CCGCGGATGGAAATGGAGACACCGGACCCCATTTCCGCCACTCCTCTACC -402  
 GAGATGATTCC TTCATCGCAA ACGT CGAATTCCTCGTATGAGAACGCAA -352  
 AATCGAGGAAGTCATAAG CAATCTCTGGCCAACAGCTACGAGATTACGGC -302  
 GGTGAAACAGTAG CGACG GAGAGAAA TCGGCTACGGATGCTCCAGC GATA -252  
 CAACGCATcgtttttactgtttgggcttctcgaggaataataatttaatt -202  
 ttacggggttaa gtgaataactattgggctttaatgaaactaaggccagtg -152  
 agctttaaccttgatt gata cacttcaagtttaattggttc gataa ttttt -102  
 tgtttttccgaaaacg agaaa tattaatgg gctttaatgaaactgcgggc -52  
 caat agtcttagagcttgaataataggaatttatttaatc ggata aat -2  
 taaacaat tagtagctc taaagaaa aaag gattcctaaaaaatcagtcact +49  
 cctctt aatcttctcctatctctcattttcgtgggttttg tttttg ttat +99  
 cttcttcgttt ggatatt attacatttgggactcaaga agaaa t cgaatc +149  
 tatcgtgtgtgtagattgcttctctctat ctctt ctctcgctacacaaca +199  
**ATG** 3' +202

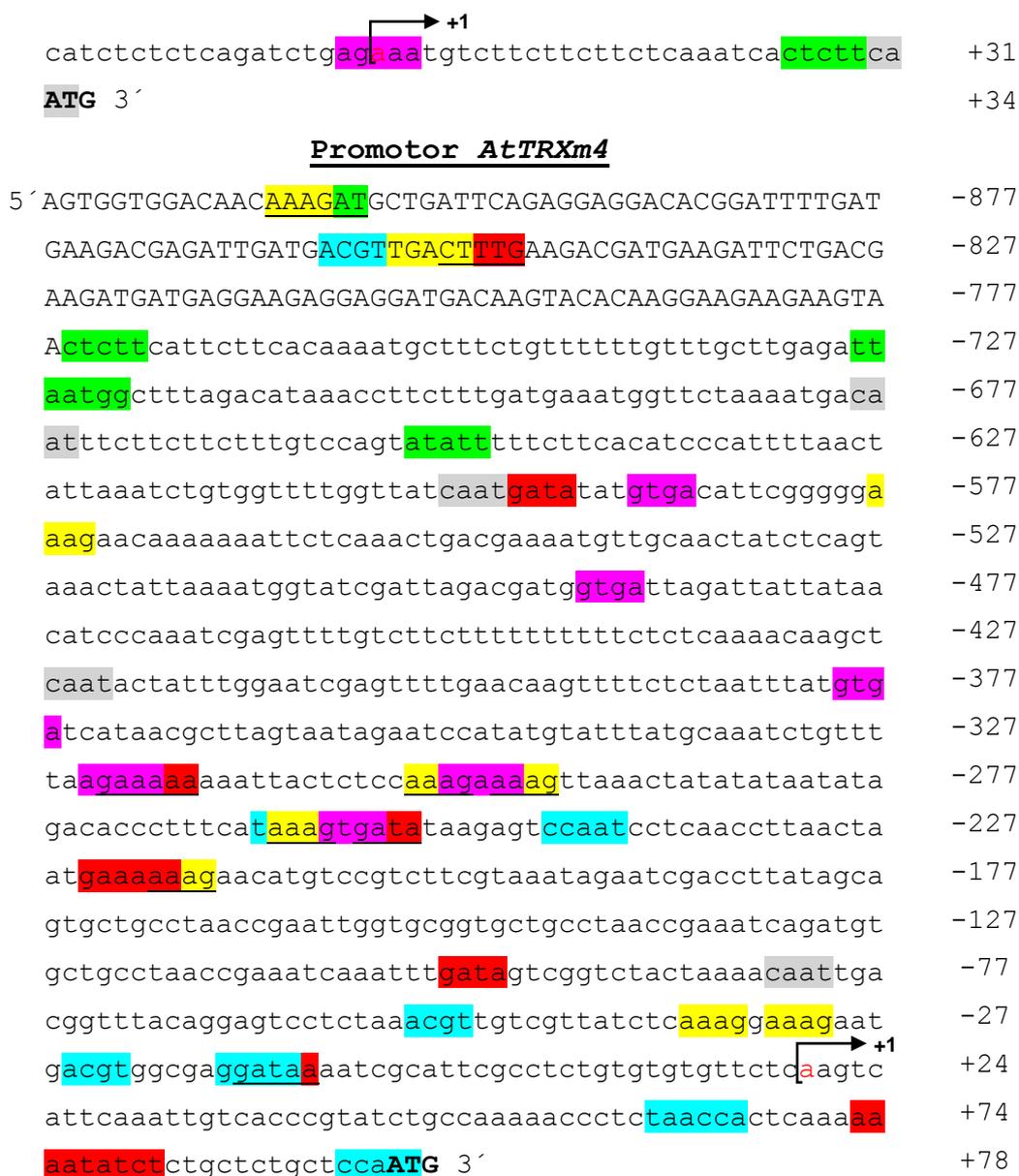
**Promotor *AtTRXm2***

5' Tagatttttaagatttt gtttttg tttttcatttttcaagagctaattgtc -864  
 ataccatta ccaat caagtttttaaaatgttggttttcca agaaa ataact -814  
 ttgctataatctttttttt gtcacatc gataatt atttaggattcaacgaa -764  
 ccaat tttgaa agaaa attgt taacaaaag cgaatttttcatgccaaatag -714

ttttttattcaaaatTTtagactTTtagttatcttataagcaagcgttat -664  
 aatttatttatttttttaaagaaaatTTtgagaaaaaatTgcgaaaaa -614  
 atgtcaggagatcttcaaatgttcaaaaaatacaaaaaaaaaaaaaaaaa -564  
 aaaaaaatttagtgtggggtaaataatacgtTTtaaattttattgactTTT -514  
 catttcaatagtcacttttagtgactTTcttatttcagtcgctaactttt -464  
 tgttgatgTTGCCAAATAGTCATAAATTGACCCGAGATCACAAATTGC -414  
 gggtaacggaactTTgttaaatttctgttaaattccacaagtgactTTG -314  
 taaaaaaaaaaagTgcaactggcctaataatgagcccaataaaataatct -264  
 caaagTTtttatgggcttattacagatgggcttagtcagagcactatctt -214  
 acccaacaattaaaaaaaaaattacaatTatgTTTTcgTTTTctacttt -164  
 tttcggttattttgggcaaatgataTctacagctcaacaatacaaaaaa -114  
 ttcaaaaatattTcaatttattttctcgattTTTTTcacaactgtatt -64  
 ttaattgtatttttagtagaaaTacttatttttccaaaaatattTgtttg -14  
 tgttgatgtatatataaaaaatctTgcacagtgTTTTgtctacattttct +37  
 ctTccattagttcgttatctTTTTattttctctatctatctggatattT +87  
 tttttcacttgggattTtgagaaaTctctctctctctatctatagcc +137  
**ATG** 3' +140

**Promotor *AtTRXm3***

5' Tcccctatcaccaaagatgtccaataatttcccacggaggaccattttt -920  
 catgccaaaaggatgttccctcaaccactTTtaactTTaactgatgaaaa -870  
 ctctTggccagtgccctgatctttagaattttcttctccatccaagacc -820  
 ttgaggtgagttgctttcacagccaaaaaaactTTTTatggattagaaa -770  
 actTTTTttggattagataggatgaacacactTattctTacaatgatgtc -720  
 gaaacaaagagtagatattTgcttcagctcgaaaccttattTgttttct -670  
 tgagtggTcttatacccaaccctccttaacttcgTTgtaaatggTTTTct -620  
 ccagcttgcttcacaaatcatgatcatccttactTacaatcattctcaa -570  
 Tttcaccaccttcttctatatatatcacacacgaactaacataaatatat -520  
 TaaaacttaacaaattgactagaaaaaactTTtaataaaaatactttatat -470  
 TaccattttcatatgcttcaaatcctaaTaaaccaactTgtgactTgtaaatt -420  
 aatgTTtagcattTTTTgggaacaagacaacgtTctaaaactcgagctcca -370  
 accataatTgaatgctaaatcaccaaaaactTcaaaattatctaaattT -320  
 TaaagtgaTTTTTgtTTTTgtcggctcaccacataaccaTatatata -270  
 tatatatataTaaTaaaccaTaaaccaatTatatatggTTatgtgggtaaga -220  
 ttaagaTaaaccaTaaaccaatTatctagaaaTcaggattggaagccaaat -170  
 TggatcatggtTtactatcattaactcgattggTtcgaccgaattctata -120  
 attattattTaaataaaaataaataaacaaataaataaataattcatctgg -70  
 acaagtggaagtTcggttagtgggaccactTTTTctccgTTTacgtTTTT -20



- Motivos presentes en genes que se expresan en raíces.
- Motivos presentes en genes que se expresan en flores.
- Motivos presentes en genes relacionados con el metabolismo del carbono.
- Motivos relacionados con regulación por luz.
- Motivos presentes en genes relacionados con el desarrollo de las semillas y el embrión.
- Motivos presentes en genes relacionados con la respuesta a estrés.

Figura S1.- Motivos reguladores identificados dentro de la región promotora (1000 pb) de los genes *AtTRXf1* y *f2* y *AtTRXm1*, *m2*, *m3* y *m4*. Las categorías se indican con distintos colores, o subrayadas en caso de coincidencia. El sitio de inicio de la transcripción “+1” es indicado mediante una flecha.

---

## B.- Abreviaturas.

2-Cys PRX : 2-Cys peroxirredoxina

A : Absorbancia (densidad óptica)

ADP : Adenosín difosfato

AMP : Adenosín monofosfato

*A. thaliana* : *Arabidopsis thaliana*

*A. tumefaciens* : *Agrobacterium tumefaciens*

ATP : Adenosín trifosfato

$\beta$ ME : B-mercapto etanol

ADNAc : ADN complementario

ADN : Ácido desoxirribonucleico

AGP : ADP-glucosa pirofosforilasa

ARN : Ácido ribonucleico

cFBPasa1 : Fructosa-1,6-bifosfatasa cloroplastídica 1

cyFBPasa : Fructosa-1,6-bifosfatasa citosólica

DAB : 3,3'-diaminobencidina

dNTPs : Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato

D.O. : Densidad óptica

Dpg : Días post-germinación

Dpi : Días post-imbibición

DTT : Ditioneitol

*E. coli* : *Escherichia coli*

EDTA : Ácido etilén diamina tetraacético

Fd : Ferredoxina

FNR : Ferredoxín NADP<sup>+</sup> reductasa

FPLC : Cromatografía rápida de proteínas

Fv/Fm : Eficiencia fotosintética

FTR : Ferredoxín tiorredoxín reductasa

G6PDH : Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GFP : Proteína verde fluorescente (Siglas del inglés)

g : Gramos

GUS : β-Glucuronidasa

GAPDH : Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GRX : Glutarredoxina

h : horas

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peróxido de hidrógeno

HEPES : Ácido 4-(2-hidroxyetil) piperacina-1-etanosulfónico

HXK : Hexoquinasa

INV : Invertasa

IPTG : Isopropil tiogalactósido

kDa : kilodalton

KO : *Knock-out*

l : Litro

LB (medio)/LBA : Medio Laurie-Bertoni líquido/sólido

M : Molar

MDHR : Monodehidroascorbato reductasa

MES : Ácido morfolino 2-Netanosulfónico propan-sulfónico

mg : Miligramos

ng : nanogramos

μg : Microgramos

min : Minutos

mM : milimolar

mm : Milímetros

ml : Mililitros

MS (medio) : Medio Murashige and Skoog

NADPH/NADP<sup>+</sup> : Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato formas reducida/oxidada

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotido difosfato, formas reducida

NADP<sup>+</sup>-MDH : Malato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup>

NBT : Nitroazul de tetrazolio (Siglas del inglés)

nm : Nanómetro

NTR : NADPH-tiorredoxín reductasa

NTRC : NADPH-tiorredoxín reductasa C

OPP : Vía oxidativa de las pentodas fosfato (Siglas del inglés)

PAR : Radiación fotosintéticamente activa (Siglas del inglés)

pb : Pares de bases

PBS : Tampón fosfato salino

PCR : Reacción en cadena de la polimerasa (Siglas del inglés)

PDI : Protein-disulfuro oxidasa

PGI : Fosfoglucoisomerasa

*P. sativum* : Guisante (*Pisum sativum*)

PK : Piruvato kinasa

PRK : Fosforibulokinasa

p/v : Peso/volumen

PS : Fotosistema

ROS : Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR : Reacción retrotranscripción seguida de una PCR

rpm : Revoluciones por minuto

s : Segundos

SBPasa : Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa

SDS : Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE : Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con SDS (Siglas del inglés)

-SH : Grupo tiol

SOD : Superóxido dismutasa

SRX : Sulfirredoxina

TBE : Tampón Tris-Borato-EDTA

tBHP: Tert-butilhidroperóxido

TCA : Ácido tricloroacético

*T<sub>m</sub>* : *Temperature melting*

Tris : Tris-hidroximetil-aminometano

TRX : Tiorredoxina

U : Unidad enzimática

v/v : Volumen/volumen

X-Gal : 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## C.- Índice de figuras.

### Figura 1.- Página 5

Esquema del plegamiento tiorredoxina típico. El sitio activo (WCG/PPC) se localiza en el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha 2$ . N: extremo amino-terminal; C: extremo carboxi-terminal.

### Figura 2.- Página 7

A) En la parte inferior de la estructura secundaria se muestran, en código de una letra, los residuos conservados de la estructura de la TRX h1 de *A. thaliana*, código PDB nº 1XFL (Peterson et al., 2005). B) las regiones conservadas se encuentran en el centro y alrededor del sitio activo de la TRX vistos desde dos posiciones diferentes (anterior y posterior). Los restos conservados en la estructura de la proteína se muestran en la presentación siguiendo un modelo tipo stick con diferentes colores: Trp (naranja), residuos cargados (magenta), Cys (cian), Gly (amarillo), Phe (verde), la Thr (azul) y Pro (rojo). La región hidrofóbica (verde), la región cargada (magenta), el grupo estructural expuesto (naranja) y el puente disulfuro (cian) se indican con una forma oval semitransparente. El centro activo solo es accesible para las reacciones de catálisis enzimática desde un lado de la proteína, representado en la figura de la derecha.

### Figura 3.- Página 10

Mecanismo de reducción de proteínas diana mediado por TRXs. Una representación esquemática paso por paso del mecanismo de reacción se muestra en la parte superior. A) La reacción se inicia con un ataque nucleofílico sobre la Cys N-terminal del motivo conservado WCGPC (1). El tiolato de la Cys nucleofílica se estabiliza por dos enlaces de hidrógeno con el grupo NH de la Gly y el grupo SH de la Cys C-terminal (código PDB: 1XFL). B) Como resultado, se forma un complejo de disulfuro mixto intermedio entre la TRX y la proteína diana, que a su vez es reducido por un ataque nucleofílico de la Cys C-terminal del motivo WCGPC (2). El tiolato en la Cys C-terminal se estabiliza con dos enlaces de hidrógeno de amida de cadena principal, lo que disminuye su pKa de 7,4. Para ser más susceptible al ataque nucleofílico de la Cys C-terminal, la Cys N-terminal de la TRX se encuentra estéricamente más cerca de ésta. C) El ciclo de reducción catalítica se detiene con la liberación de una proteína diana reducida y la TRX oxidada.

### Figura 4.- Página 19

Representación esquemática de los sistemas de reducción de TRXs plastidiales FTR (arriba) y NTRC (abajo).

### Figura 5.- Página 22

Representación esquemática de los sistemas de reducción de TRXs en cloroplastos (izquierda) y plastidios no fotosintéticos (derecha). En el cloroplasto, la FTR reduce por un lado a las TRXs plastidiales con el poder reductor proporcionado por la Cadena de Transporte Electrónico (CTE) a través de la ferredoxina (Fd) y por otro a la NTRC que a su vez puede reducir alternativamente a las propias TRXs. Las TRXs situadas en plastidios no fotosintéticos son reducidas por el sistema FNR/Fd/FTR usando el poder reductor (NADPH) generado por la vía oxidativa de las pentosas fosfato en el citosol, el cual tiene como precursores metabólicos a los azúcares solubles sintetizados en cloroplastos.

*Figura 6.- Página 28*

Mecanismos de regulación redox tiol/disulfuro en plastidios. Los esquemas presentan cuatro mecanismos de regulación tiol/disulfuro como se explica en el texto: A) interacciones redox transitorias de corta duración, B) formación transitoria de complejos entre elementos de red, C) competición entre múltiples dianas y D) formación constitutiva de complejos.

*Figura 7.- Página 32*

Esquema de la señalización redox mediada por TRX f y m en plástidos. Se muestran los procesos fisiológicos centrales reguladas por estas isoformas. Flechas: azul discontinuo (transporte electrónico), azul continuo (sistema de reducción de TRXs), verde (activación) y rojo (represión).

*Figura 8.- Página 40*

Esquema de la señalización redox mediada por las TRX x e y en plástidos. Se muestran los procesos fisiológicos centrales reguladas por estas isoformas. Flechas: azul discontinuo (transporte electrónico), azul continuo (sistema de reducción de TRXs), verde (activación) y rojo (represión).

*Figura 9.- Página 43*

Esquema de la señalización redox mediada por TRX z en plástidos. Se muestran los procesos fisiológicos centrales reguladas por estas isoformas. Flechas: azul discontinuo (transporte electrónico), azul continuo (sistema de reducción de TRXs), verde (activación) y rojo (represión).

*Figura 10.- Página 55*

Representación esquemática del vector pMBL. Arriba: f1 (-) ori: Origen de replicación f1 (-), SC: sitio de clonación, Plac: Promotor del gen lac, pUC ori: origen de replicación pUC, AmpR: gen de resistencia a ampicilina. Abajo: Secuencia de la región SC. Las secuencias subrayadas corresponden a los oligonucleótidos de secuenciación U21 (azul) y Rev21 (verde). La posición del asterisco (\*) indica el sitio de la clonación AT dentro de la diana de restricción para Eco RV (tipografía de color rojo).

*Figura 11.- Página 56*

Representación esquemática del vector pET28b. Arriba: f1 (-) ori: Origen de replicación f1 (-), pUC ori: origen de replicación pUC, KanR: gen de resistencia a kanamicina T7, lacI: Secuencia codificante de la proteína LacI, SC: sitio de clonación. Abajo: Secuencia de la región SC. Las secuencias de tipografía de color verde corresponden con el promotor de T7, mientras que las de color azul lo hacen con el terminador T7. Las secuencias subrayadas corresponden a los oligonucleótidos de secuenciación F-T7 (rojo) y R-T7 (verde). La secuencia resaltada en gris corresponde con el operador de lacI. Las distintas dianas para enzimas de restricción usadas están designadas con tipografía de distinto color: NdeI (rojo), BamHI (naranja) y EcoRI (verde). La secuencia con tipografía rosa se corresponde con la cola de histidina terminal.

*Figura 12.- Página 57*

Representación esquemática del mecanismo de clonación Gateway. ORF: Marco abierto de lectura (Open Read Frame). attL y attR representa las secuencias flanqueantes de reconocimiento presentes en los vectores de entrada y salida, respectivamente. attP y attB representa las secuencias flanqueantes conjugadas tras la reacción mediada por la LR clonasa.

Figura 13.- Página 58

Representación esquemática del plásmido pENTR/D-TOPO. Las regiones attI1 y attI2 se corresponden con las zonas de recombinación. SC: sitio de clonación, KanR: gen de resistencia a kanamicina pUC ori: origen de replicación pUC.

Figura 14.- Página 58

Mecanismo de clonación en pENTR/D-TOPO (Adaptado de “pENTR Directional TOPO Cloning user manual”).

Figura 15.- Página 59

Representación esquemática del plásmido pGWB4.

Figura 16.- Página 63

Representación de los loci correspondientes a los genes AtTRXf1 y AtTRXf2. Se muestran la disposición y tamaños (en pares de bases) de promotores, exones (flechas de trazo grueso) e intrones (trazo fino) de cada gen, así como la posición de la inserción de T-ADN en los mismos. En azul: oligonucleótidos usados para el aislamiento de mutantes; en rojo: oligonucleótidos usados clonación de genes; en verde: oligonucleótidos usados para la clonación de los ADNc; en naranja: oligonucleótidos usados en análisis de expresión génica.

Figura 17.- Página 64

Representación de los loci correspondientes a los genes AtTRXm1, AtTRXm2, AtTRXm3 y AtTRXm4. Se muestra la disposición y tamaños (en pares de bases) de promotores, exones (flechas de trazo grueso) e intrones (trazo fino) de cada gen, así como la posición de la inserción de T-ADN. En azul: oligonucleótidos usados para el aislamiento de mutantes; en rojo: oligonucleótidos usados clonación de genes; en verde: oligonucleótidos usados para la clonación de transcritos; en naranja: oligonucleótidos usados en análisis de expresión génica.

Figura 18.- Página 66

Esquema general de las etapas de PCR usadas.

Figura 19.- Página 68

Esquema general de las reacciones implicadas en el protocolo de mutagénesis dirigida. P1 y P2: oligonucleótidos flanqueantes; M1 y M2: oligonucleótidos internos que contienen la mutación puntual.

Figura 20.- Página 71

Obtención del valor de Ct.

Figura 21.- Página 80

Reacciones llevadas a cabo para ensayo enzimático de actividad FBPasa. PGI, Fosfoglucoisomerasa; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa).

Figura 22.- Página 90

Esquema del ensayo enzimático en la medida de azúcares solubles.

Figura 23.- Página 91

Esquema de la determinación de azúcares. Cada una de las variaciones en las DO corresponde a la contribución de cada una de las enzimas HK (hexokinasa), PGI (fosfoglucoisomerasa) e INV (invertasa).

*Figura 24. Página 94*

Arriba, esquema sobre el funcionamiento del IRGA (adaptado de Alan Rhodes, Mulkey & Smith 1998). Abajo, fotografía del equipo completo (tomada de la página web [www.licor.com](http://www.licor.com)).

*Figura 25.- Página 96*

Esquema de los posibles destinos de la energía lumínica absorbida por el fotosistema II.

*Figura 26.- Página 97*

Construcciones que portan la fusión traduccional de las secuencias promotoras de las TRXs f y m1 de guisante (Barajas-López et. al., 2007).

*Figura 27.- Página 112*

Arriba, expresión de los genes codificantes para AtTRXs f y m de *A. thaliana* en distintos órganos. Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron usando como molde ADNc retrotranscrito de muestras de ARN aislado de los cotiledones, raíces, roseta, tallo, flores y silicuas. Los niveles de transcripción son el resultado de tres experimentos independientes y se normalizaron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para relativizar los niveles de expresión se utilizaron los valores de AtTRXf1 en cotiledones. Abajo, gráficos sectoriales dónde se representa, para cada órgano analizado, los porcentajes proporcionales correspondientes a cada gen respecto de la expresión relativa total.

*Figura 28.- Página 114*

Arriba, cuantificación de TRXs f y m en distintos órganos de *A. thaliana* (cotiledones, raíz, roseta, tallo, flores y silicuas) expresado como abundancia de proteína en partes por millón (ppm), usando los datos suministrados por PaxDB (Wang et al., 2012)(Wang et al., 2012)(Wang et al., 2012). Abajo, gráficos sectoriales dónde se representa, para cada tejido analizado, los porcentajes correspondientes proporcionalmente a cada proteína respecto del total de proteína cuantificada.

*Figura 29.- Página 119*

Estructura general de las construcciones que portan la fusión traduccional de las secuencias promotoras más los genes codificantes de las TRXs f y m de *A. thaliana*. AttB1 y AttB2: regiones de recombinación para la subclonación; P: región promotora de cada gen; TRXs: secuencias génicas correspondientes a los genes AtTRXf1, AtTRXf2, AtTRXm1, AtTRXm2, AtTRXm3 y AtTRXm4.

*Figura 30.- Página 120*

Inmunodetección por western-blotting de las proteínas de fusión en las distintas líneas transgénicas f1::GFP, f2::GFP, m1::GFP, m2::GFP, m3::GFP y m4::GFP, utilizando el anticuerpo anti-GFP. La proteína soluble se extrajo de hojas de roseta de cada una de las líneas transgénicas obtenidas, se cuantificó y se analizó utilizando 40  $\mu$ g. Como control de carga se muestra la banda correspondiente a la subunidad mayor de la RUBISCO teñida con solución de rojo Ponceau.

*Figura 31.- Página 122*

Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRXf1::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo (A) y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (B, flechas), región del hipocotilo (C) y región apical de la raíz (D). Escala de las barras: B= 30  $\mu$ m; A = 50  $\mu$ m; C y D = 100  $\mu$ m.

Figura 31 (continuación).- Página 123

Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRXf1::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: sépalo (E); disección en la que se muestra estigma, estilo, ovario y pétalos (F); flor completa, con detalle de estigma (G, flecha); parte apical de silicua (H), semilla con embrión en estado de desarrollo temprano de cotiledon lineal (I). Escala de las barras: I = 50  $\mu$ m; E, F G y H = 500  $\mu$ m.

Figura 32.- Página 124

Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRXf2::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo (A) y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (B, flechas), región del hipocotilo (C) y región apical de la raíz (D). Escala de las barras: B = 30  $\mu$ m; A = 50  $\mu$ m; D = 200  $\mu$ m; C = 500  $\mu$ m.

Figura 32 (continuación).- Página 125

Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRXf2::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: flor completa, con detalle de óvulo (E, flechas); sépalo (F); pétalo (G); parte apical de silicua (H) y semilla (I). Escala de las barras: I = 200  $\mu$ m; E = 300  $\mu$ m; F, G y H = 500  $\mu$ m.

Figura 33.- Página 128

Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRX m1::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo (A) y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (B); sépalos (C); pétalos (D) y filamento y antera (E). Escala de las barras: A y B = 50  $\mu$ m; C, D y E = 500  $\mu$ m.

Figura 33 (continuación).- Página 129

Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRX m1::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: parte basal (F) y apical (G) de la silicua; semilla madura, con embrión en su interior (H) y región apical de la raíz (I). Escala de las barras: 50  $\mu$ m (H, I) y 500  $\mu$ m (G, F).

Figura 34.- Página 130

Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRXm2::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (A, flechas); cotiledón (B); antera y filamento (C) y detalle de antera (D). Escala de las barras: A = 50  $\mu$ m; D = 100  $\mu$ m; B = 200  $\mu$ m; C = 500  $\mu$ m.

Figura 34 (continuación).- Página 131

Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRXm2::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: parte apical (E) y basal (F) de la silicua; semillas maduras, con embrión en su interior (G); raíz secundaria (H) y raíz principal (I). Escala de las barras: H e I = 100  $\mu$ m; E, F y G = 500  $\mu$ m.

Figura 35.- Página 132

Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRX m3::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de *A. thaliana*: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo (A) y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (B); cotiledones (C) zona de hipocotilo y radícula (D) de plántulas y región media de la raíz (E). Escala de las barras: B = 30  $\mu$ m; A y E = 50  $\mu$ m; D = 300  $\mu$ m; C = 500  $\mu$ m.

*Figura 35 (continuación).- Página 133*

*Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRXm3::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de A. thaliana: antera y filamento (F); sépalo (G); pétalo (H); parte apical de silícula, mostrando semillas inmaduras a través de las valvas (I) y radícula de embrión maduro emergiendo (J). Escala de las barras: J = 200  $\mu$ m; F, G, H e I = 500  $\mu$ m.*

*Figura 36.- Página 134*

*Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRXm4::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de A. thaliana: cloroplastos de hojas de roseta de 25 días de desarrollo (A) y detalle indicando cloroplastos de células guarda estomáticas (B); sépalos (C); pétalos (D) y detalle de antera y filamento (E). Escala de las barras: A y B = 50  $\mu$ m; E = 100  $\mu$ m; C y D = 500  $\mu$ m.*

*Figura 36 (continuación).- Página 135*

*Localización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión AtTRX m4::GFP en la anatomía de plantas transgénicas de A. thaliana: parte basal de la silícula (F); semilla madura (G); embriones en estadio corazón (H) y estadio maduro (I); detalle de zona de elongación de la raíz (J) y ápice de la misma (K). Escala de las barras: H e I = 100  $\mu$ m (H, I); E, F y G = 500  $\mu$ m.*

*Figura 37.- Página 136*

*Localización mediante microscopía confocal de las proteínas de fusión AtTRXm1::GFP, AtTRXm2::GFP, AtTRXm3::GFP y AtTRXm4::GFP en raíces de 10 días, después de germinación procedentes de líneas transgénicas de A. thaliana. De forma previa a su análisis, las raíces fueron tratadas con yoduro de propidio (dilución XX) durante 5 minutos. Parte media (A, C, E, G) y parte apical (B, D, F y H). Escala de las barras: 200  $\mu$ m.*

*Figura 38.- Página 137*

*Electroforesis SDS-PAGE (15% acrilamida) de las TRXs purificadas. Para la tinción de las proteínas se empleó el azul Coomassie.*

*Figura 39.- Página 138*

*Ensayo turbidimétrico de reducción de insulina por las TRXs recombinantes purificadas. Se muestra el incremento de densidad óptica (D.O.) a 600 nm registrados a lo largo del tiempo (min.) debido a la precipitación de la insulina.*

*Figura 40.- Página 139*

*Inmunodetección de las TRXs recombinantes purificadas usando los anticuerpos TRX f y TRX m1 de guisante. Se ensayaron cantidades crecientes (en ng) de proteína. Como control se usaron las formas purificadas de PsTRX f y PsTRXm1.*

*Figura 41.- Página 140*

*Especificidad en la activación redox de la FBPasa mediada por las TRXs f y m de A. thaliana. (A) Diferencias en la movilidad electroforética de las formas reducida y oxidada de la FBPasa en ensayos de reducción con DTT. (B) Análisis comparativo de la capacidad reductora de cFBP1 de las isoformas TRX f1 y f2. (C) Eficiencia relativa de las distintas isoformas de las TRXs f y m en la reducción de la FBPasa. Los valores indicados en la parte superior del panel B se refieren a las concentraciones en  $\mu$ M de la cantidad de TRX utilizada en los ensayos de reducción.*

Figura 42.- Página 141

Activación de la FBPasa por TRXs plastidiales. (A) Curva de activación de cFBP1 por concentraciones crecientes de TRX f1 y f2. (B) Actividad relativa de la FBPasa de *A. thaliana* en ensayos de activación con las diferentes TRXs f y m. (C) El mismo ensayo en que B con la FBPasa de guisante. Los ensayos de A y B se llevaron a cabo en las mismas condiciones que los utilizados en la figura 41B y C, respectivamente.

Figura 43.- Página 143

Geles bidimensionales con las proteínas diana capturadas mediante cromatografía de afinidad a partir de extractos frescos de raíces de plantas de *A. thaliana* de 10 días, usando TRX f1 CS (F1 Raíz) y TRX f2 CS (F2 Raíz).

Figura 44.- Página 146

Categorías (A) y funciones moleculares (B) de las proteínas diana obtenidas para TRX f1 y TRX f2 en raíces de 10 días, comparadas por frecuencia normalizada.

Figura 45.- Página 147

Geles bidimensionales con las proteínas diana capturadas mediante cromatografía de afinidad a partir de extractos frescos de inflorescencias de plantas de *A. thaliana* de 25 días, usando las formas mutadas y recombinantes TRX f1 CS (F1 Inf.) y TRX f2 CS (F2 Inf.).

Figura 46.- Página 151

Categorías (A) y funciones moleculares (B) de las dianas obtenidas para las TRX f1 y TRX f2 en inflorescencias de *Arabidopsis* de 25 días, comparadas por frecuencia normalizada.

Figura 47.- Página 152

Reacciones de PCR para verificar el aislamiento de las líneas homocigotas mutantes *trxf1* y *trxf2* usando parejas de oligonucleótidos flanqueantes y específicos; B: Amplificación con pareja de oligonucleótidos, sin ADN; C: Amplificación con la pareja de oligonucleótidos más 1  $\mu$ L de ADN genómico de la línea silvestre Col0; P: Amplificación con la pareja de oligonucleótidos, más 1  $\mu$ L de ADN genómico de la línea mutante. Las condiciones de amplificación fueron 30 ciclos, 25 s de elongación y una Tm de 55 °C para *trxf1*, y de 60 °C para *trxf2*.

Figura 48.- Página 153

A) PCR semicuantitativa para aislamiento del doble mutante *trxf1 trxf2*. 18s: oligonucleótidos para amplificar el gen codificante de la subunidad ribosomal 18s; TRX: oligonucleótidos específicos y flanqueantes para la amplificación de los genes *AtTRXf1* y *AtTRXf2*. Las condiciones de amplificación para el gen 18s fueron 28 ciclos para Col0, 25 s de elongación y una Tm de 55 °C. Las condiciones de amplificación para los genes codificantes de TRXs en las líneas mutantes fueron: 38 ciclos para *AtTRXf1* y 40 ciclos para *AtTRXf2*; 25 s de elongación en ambos casos y una Tm de 50 °C en el caso del gen *AtTRXf1* y de 55 °C en el caso de *AtTRXf2*. B) Reconocimiento inmunológico y cuantificación de la señal obtenida. Se utilizó el anticuerpo TRX f de guisante frente a 30  $\mu$ g de extracto de roseta pertenecientes a la línea control Col0 y los mutantes *trxf1* y *trxf2*. C) Western-blotting en el que fue utilizado el anticuerpo PsTRXf. La proteína soluble se extrajo de rosetas correspondientes a las líneas Col0 y *trxf1 trxf2*, se cuantificó y se analizó utilizando 35  $\mu$ g. Como control de carga se muestra la banda correspondiente a la subunidad mayor de la RUBISCO teñida con solución de rojo Ponceau.

*Figura 50.- Página 155*

A) PCR semicuantitativa para aislamiento de mutantes *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*. 18s: oligonucleótidos para amplificar el gen codificante de la subunidad ribosomal 18s (*At18s-F/At18s-R*). TRX: oligonucleótidos específicos para la amplificación de derivados de los genes *AtTRXm1*, *AtTRXm2*, *AtTRXm3* y *AtTRXm4*. Las condiciones de amplificación para el gen 18s fueron 28 ciclos para Col0 y 26 para LE, 25 s de elongación y una *Tm* de 55 °C; Por último las condiciones de amplificación para los genes codificantes de TRXs en las líneas mutantes fueron: 32 ciclos para *AtTRXm2*, 38 ciclos para *AtTRXm1*, *AtTRXm3* y *AtTRXm4*; 25 s de elongación en todos los casos y una *Tm* de 50 °C en el caso del gen *AtTRXm1* y de 55 °C en el caso de *AtTRXm2*, *AtTRXm3* y *AtTRXm4*. B) Reconocimiento inmunológico y cuantificación de la señal obtenida. Se utilizaron el anticuerpo TRX m1 de guisante frente a 30 µg de extracto de roseta pertenecientes a las líneas control Col0 y LE y los mutantes *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*.

*Figura 51.- Página 156*

Expresión de los genes *AtTRX f1*, *f2*, *m1*, *m2*, *m3*, *m4* (A) y de los genes *AtNTRC* y *AtTRXy1* (B) en la línea silvestre Col0 (control de expresión) y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4*; y en línea silvestre LE (control de expresión) y el mutante *trxm3*. Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron usando como molde ADNc retrotranscrito de muestras de ARN aislado de hojas de 25 días. Las plantas crecieron bajo condiciones de día largo. Los niveles de transcripción son la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes que se normalizaron por el método 2- $\Delta\Delta CT$ . Para relativizar los niveles de expresión se utilizaron los valores de *AtTRXf1* (A) y *AtNTRC* (B) en Col0 y LE. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  según t-student).

*Figura 52.- Página 158*

Curvas de germinación (en %) de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* comparadas con el control Col0, y de la línea mutante *trxm3* comparada con el control LE, a lo largo de 7 días de incubación in vitro bajo condiciones de día largo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

*Figura 53.- Página 159*

Curvas de peso fresco (izquierda) y áreas foliares en mm<sup>2</sup> (derecha) de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* comparadas con el control Col0, y de la línea mutante *trxm3* comparada con LE, a lo largo de 30 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Cada punto es la media del peso de 5 plantas y las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

*Figura 54.- Página 160*

Fenotipos de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* comparadas con la línea silvestre Col0, y de la línea mutante *trxm3* comparada con la línea silvestre LE, a los 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo.

*Figura 55.- Página 161*

Número de hojas por roseta de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* en relación con la línea silvestre Col0, y de la línea mutante *trxm3* comparado con la línea silvestre LE, a lo largo de 30 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Cada punto es la media del número de hojas de 5 plantas y las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

Figura 56.- Página 162

Curvas de crecimiento (izquierda) y de velocidad de crecimiento (derecha) de la raíz primaria de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* en comparación con el silvestre *Col0*, y de la línea mutante *trxm3* comparada con el silvestre *LE*, a lo largo de 11 días de crecimiento *in vitro* en placas verticales bajo condiciones de día largo. Cada punto es la media de las medidas de 6 plantas distintas y las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

Figura 57.- Página 163

Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) que ilustran las diferencias morfológicas entre estomas de la cara abaxial de hojas de roseta de 25 días crecidas bajo condiciones de día largo, pertenecientes a la línea control *Col0* y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, y a la línea control *LE* y el mutante *trxm3*. Escala de las barras = 10  $\mu\text{m}$ .

Figura 58.- Página 164

Imágenes de microscopía óptica de secciones de hojas de roseta pertenecientes a la línea control *Col0* y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, y a la línea control *LE* y el mutante *trxm3*. Las plantas crecieron durante 25 días bajo condiciones de día largo. Las cortes semi-finos correspondientes a cada línea fueron previamente teñidos con azul de toluidina. Escala de las barras = 25  $\mu\text{m}$

Figura 59.- Página 165

Número de cloroplastos promedio por célula, medido para las líneas control *Col0* y *LE* y las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*.

Figura 60.- Página 166

Imágenes de microscopía electrónica de secciones de hojas de roseta pertenecientes a la línea control *Col0* y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, y a la línea control *LE* y el mutante *trxm3*. Las plantas crecieron durante 25 días bajo condiciones de día largo. Pueden diferenciarse los cloroplastos y, en el interior de ellos, se pueden observar los gránulos de almidón como estructuras blancas menos electrodensas que el estroma. Escala de las barras = 2  $\mu\text{m}$ .

Figura 61- Página 167

Distribución de gránulos de almidón observados por cloroplasto, en base a las imágenes obtenidas, mediante microscopía electrónica, de secciones de hojas pertenecientes a la línea control *Col0* y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, y a la línea control *LE* y el mutante *trxm3*.

Figura 62.- Página 168

Imágenes de microscopía óptica correspondientes a cilindros vasculares de la zona de elongación de raíces, pertenecientes a la línea control *Col0* y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, y a la línea control *LE* y el mutante *trxm3*. Las plantas crecieron durante 12 días bajo condiciones de día largo. Las cortes semi-finos correspondientes a cada línea fueron previamente teñidos con azul de toluidina. Escala de las barras: *trxm4* = 20  $\mu\text{m}$ ; *Col0*, *trxf2* *trxm1*, *trxm2*, *LE* y *trxm3* = 25  $\mu\text{m}$ ; *trxf1* = 50  $\mu\text{m}$ .

Figura 63.- Página 169

Imágenes de microscopía confocal correspondientes a raíces pertenecientes a la línea control *Col0* y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, y a la línea control *LE* y el mutante *trxm3*. Las plantas crecieron durante 12 días bajo condiciones de día largo. Previa observación las raíces analizadas fueron tratadas con yoduro de propidio. Escala de las barras = 50  $\mu\text{m}$ .

**Figura 64.- Página 170**

Contenido en clorofilas a, b y totales (izquierda) y ratio clorofila a / clorofila b (derecha) de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxf1 trxf2* (A) y *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* (B) comparados con la línea control *Col0*, y de la línea mutante *trxm3* (C) comparada con LE. Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 6 individuos por línea. Se indican las diferencias significativas respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,01$  según t-student).

**Figura 65.- Página 171**

Contenidos en carotenoides (izquierda) y antocianinas (derecha) cuantificados en las líneas mutantes *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* comparados con la línea control *Col0*, y en la línea mutante *trxm3* comparada con LE. Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 6 individuos por línea. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,001$  según t-student).

**Figura 66.- Página 173**

Curvas de respuesta a luz de las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* en comparación con la línea silvestre *Col0*. Fueron obtenidas en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo: A, tasa de fijación de CO<sub>2</sub> o fotosíntesis neta; E, tasa de transpiración; g, conductancia estomática y Ci, concentración de CO<sub>2</sub> subestomática. Cada curva consta de 8 puntos obtenidos como la media de 5 medidas independientes para cada línea. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

**Figura 67.- Página 174**

Curvas de respuesta a luz de la línea mutante *trxm3* en comparación con la línea silvestre LE. Fueron obtenidas en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo: A, tasa de fijación de CO<sub>2</sub> o fotosíntesis neta; E, tasa de transpiración; g, conductancia estomática y Ci, concentración de CO<sub>2</sub> subestomática. Cada curva consta de 8 puntos obtenidos como la media de 5 medidas independientes para cada línea. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

**Figura 68.- Página 177**

Reconocimiento inmunológico (arriba) y cuantificación de la señal obtenida (abajo) de las proteínas *PsbD*, *PsbO* y *PsbP* en las líneas silvestres y mutantes *trx*.

**Figura 69.- Página 178**

Expresión relativa de los genes *AtSBP*, *AtcFBP1*, *AtAGP* y *AtMDH* en las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* respecto a la línea control *Col0* (arriba) y de la línea mutante *trxm3* respecto a la línea control LE (abajo). Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron usando como molde ADNc retrotranscrito de muestras de ARN aislado de hojas de 25 días. Las plantas crecieron bajo condiciones de día largo. Los niveles de transcripción son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes que se normalizaron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para relativizar los niveles de expresión se utilizaron los valores de *AtNTRC* en *Col0* (arriba) y LE (abajo). Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  según t-student).

Figura 70.- Página 179

Expresión relativa de los genes *AtPRK*, *AtCP12-1*, *AtCP12-2*, *AtCP12-3* y *AtGAPDH* en las líneas mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2* y *trxm4* respecto a la línea control *Col0* (arriba) y de la línea mutante *trxm3* respecto a la línea control *LE* (abajo). Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron usando como molde ADNc retrotranscrito de muestras de ARN aislado de hojas de 25 días. Las plantas crecieron bajo condiciones de día largo. Los niveles de transcripción son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes que se normalizaron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para relativizar los niveles de expresión se utilizaron los valores de *AtNTRC* en *Col0* (arriba) y *LE* (abajo). Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  según t-student).

Figura 71.- Página 181

Reconocimiento inmunológico y cuantificación de la señal obtenida (abajo) de la *cFBP1*, *cyFBP* y la *RUBISCO* activasa (arriba). Se utilizaron los anticuerpos *cFBP1*, *cyFBP* y *RUBISCO* activasa frente a 30  $\mu$ g de extracto de roseta pertenecientes a las líneas control *Col0* y *LE* y los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*. Las plantas crecieron durante 25 días bajo condiciones de día largo.

Figura 72.- Página 183

Determinación del contenido en glucosa, fructosa y sacarosa en líneas mutantes y control al inicio del ciclo de luz (0 h). Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de su media. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  según t-student).

Figura 73.- Página 185

Análisis del contenido en almidón en línea control *Col0* y los mutantes *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2* a las 0, 8 y 16h de un ciclo de luz de día largo. Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. A) Cuantificación de almidón en hojas de roseta de 25 días. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de su media y se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  según t-student). B) Tinción con lugol en hojas de roseta de mutantes en comparación con la línea silvestre

Figura 74.- Página 186

Análisis del contenido en almidón en líneas control *Col0* y *LE* y los mutantes *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* a las 0, 8 y 16h de un ciclo de luz de día largo. Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. A) Cuantificación de almidón en hojas de roseta de 25 días. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de su media y se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  según t-student). B) Tinción con lugol en hojas de roseta de mutantes en comparación con la línea silvestre.

Figura 75.- Página 188

Geles bidimensionales de las proteínas totales de rosetas de 25 días de las líneas *Col0*, *trxf1* y *trxf2*. Señalados con círculo rojo: spots correspondientes a péptidos reprimidos en las líneas mutantes; señalados con círculo azul: spots correspondientes a péptidos inducidos en líneas mutantes.

Figura 76.- Página 189

Geles bidimensionales de las proteínas totales de rosetas de 25 días de las líneas *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, *LE* y *trxm3*. Señalados con círculo rojo: spots correspondientes a péptidos reprimidos en las líneas mutantes; señalados con círculo azul: spots correspondientes a péptidos inducidos en las líneas mutantes.

*Figura 77.- Página 196*

*Distribución de las proteínas diferencialmente expresadas en los mutantes trxf1, trxf2, trxm1, trxm2, trxm3 y trxm4. Comparación de proteínas reprimidas (rojo) y proteínas inducidas (verde).*

*Figura 78.- Página 199*

*Categorías funcionales en las que se agrupan las proteínas diferencialmente expresadas en los mutantes trxf1 y trxf2, comparadas por frecuencias normalizadas obtenidas mediante el uso de la aplicación informática Classification SuperViewer.*

*Figura 79.- Página 200*

*Funciones moleculares de las proteínas diferencialmente expresadas en mutantes trxf1 y trxf2 comparadas por frecuencia normalizada obtenidas mediante el uso de la aplicación informática Classification SuperViewer.*

*Figura 80.- Página 202*

*Categorías funcionales en las que se agrupan las proteínas diferencialmente expresadas en los mutantes trxm1, trxm2, trxm3 y trxm4, comparadas por frecuencias normalizadas obtenidas mediante el uso de la aplicación informática Classification SuperViewer.*

*Figura 81.- 203*

*Funciones moleculares de las proteínas diferencialmente expresadas en los mutantes trxm1, trxm2, trxm3 y trxm4 comparadas por frecuencia normalizada obtenidas mediante el uso de la aplicación informática Classification SuperViewer.*

*Figura 82.- Página 204*

*Fenotipos de las líneas silvestres Col0 y LE, y los mutantes trxm1, trxm2, trxm3 y trxm4 bajo condiciones de estrés por alta intensidad lumínica. Las plantas crecieron durante 25 días bajo condiciones de día largo. A) Fenotipos obtenidos después de un tratamiento de 8 días a 600 PAR y una temperatura constante de 20 °C durante 24 h. B) Contenido de antocianinas en las hojas de roseta de las plantas sometidas a tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 4 individuos por línea. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  según t-student).*

*Figura 83.- Página 205*

*Acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en hojas de roseta de las líneas control Col0 y LE, y los mutantes trxf1, trxf2, trxm1, trxm2, trxm3 y trxm4. Tras 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo las plantas fueron sometidas in situ a las tinciones histoquímicas 3,3'-diaminobencidina (DAB) y nitroazul de tetrazolio (NBT) para mostrar los niveles acumulados de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ .*

*Figura 84.- Página 206*

*Reconocimiento inmunológico y cuantificación de la señal obtenida. Se utilizaron los anticuerpos 2 Cys-PRX y SRX frente a 30  $\mu$ g de extracto de roseta pertenecientes a las líneas control Col0 y LE y los mutantes trxf1, trxf2, trxm1, trxm2, trxm3 y trxm4. Las plantas crecieron durante 25 días bajo condiciones de día largo.*

Figura 85.- Página 208

Tasa de germinación (%) de las semillas de los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* en relación a las respectivas líneas silvestres Col0 y LE durante 7 días en un medio de cultivo suplementado con 50 mM NaCl (izquierda) y 150 mM NaCl (derecha). Las plantas crecieron bajo condiciones de día largo (16h/8h). Cada punto es la media de 3 réplicas de 30 semillas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

Figura 86.- Página 209

Tasa de germinación (%) de las semillas de los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4* en relación a las respectivas líneas silvestres Col0 y LE durante 7 días en un medio de cultivo suplementado con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (izquierda) y 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (derecha). Las plantas crecieron bajo condiciones de día largo (16h/8h). Cada punto es la media de 3 réplicas de 30 semillas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

Figura 87.- Página 210

Fenotipos de las líneas Col0, *trxf1*, *trxf2* y *trxf1 trxf2* bajo distintos tratamientos de estrés. Las plantas crecieron durante 5 días bajo condiciones de día largo y posteriormente fueron trasplantadas a medio MS (Control); medio MS suplementado con 100mM NaCl; medio MS suplementado con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado fueron sometidas durante 10 días a 8 °C en condiciones de día largo (frío) y durante 3 horas a 37 °C (choque térmico).

Figura 88.- Página 211

Fenotipos de las líneas Col0, *trxm1*, *trxm2*, *trxm4*, LE y *trxm3* bajo distintos tratamientos de estrés. Las plantas crecieron durante 5 días bajo condiciones de día largo y posteriormente fueron trasplantadas a medio MS (Control); medio MS suplementado con 100mM NaCl; medio MS suplementado con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado fueron sometidas durante 10 días a 8 °C en condiciones de día largo (frío) y durante 3 horas a 37 °C (choque térmico).

Figura 89.- Página 213

Expresión génica de TRXs f y m en plántulas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro* a los 1, 3 y 5 días después de su germinación en condiciones control y en presencia de 50 y 100 mM de NaCl. Los niveles de transcripción son el resultado de 3 experimentos independientes y se normalizaron por el método 2- $\Delta\Delta CT$ . Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones derivadas de dos preparaciones distintas de ADNc. Para relativizar los niveles de expresión se utilizó el valor de AtTRXf1 en condiciones control el día 1. Se indican las diferencias significativas con respecto a la línea control (\*  $p < 0,05$  según t-Student).

Figura 90.- Página 214

Localización histoquímica en *A. thaliana* de la expresión GUS bajo el control de los promotores de las TRXs plastidiales de guisante. (A, D, G) plantas transgénicas control transformadas con vector pBI101. (B, E, H) plántulas de *A. thaliana* con la construcción PsTRX f::GUS. (C, F, I) plántulas de *A. thaliana* con la construcción PsTRX m1::GUS. Plántulas de *A. thaliana* de 7 días fueron cultivadas en presencia (D-I), o en ausencia de luz (A-C). (G, H, I) Aumento de las áreas enmarcadas en D, E y F que muestran detalles de la zona meristemática.

*Figura 91.- Página 215*

Localización de los elementos reguladores relacionados con estrés abiótico. Se indica la longitud de los fragmentos, en el caso de PsTRXf tomando como referencia el codón de inicio (ATG) de la traducción y en el caso de PsTRXm1 el sitio de inicio de la transcripción, marcado con un triángulo invertido negro.

*Figura 92.- Página 216*

Análisis de la expresión de PsTRXf, m1 y m2 y FNR y actividad G6PDH en plántulas de *P. sativum*. Las semillas se embebieron en agua y se incubaron a 22 °C en condiciones de día largo. (A) Ilustración de las plántulas de guisante en la que se indican las diferentes partes de la anatomía utilizadas para el aislamiento de ARNm y proteínas. (B) Cuantificación del contenido relativo de ARNm (teniendo en cuenta los valores determinados para el ápice de la raíz como el valor de referencia) para los genes PsTRXf, m1 y m2 y FNR. Cada valor es la media de tres determinaciones de ADNc, y las barras de error las desviaciones estándar. (C) Reconocimiento inmunológico de las PsTRXs f y m1 en 30 µg de extractos muestreados a los 2, 3 y 5 dpi (D) Actividad G6PDH en diferentes partes de la plántula de guisante.

*Figura 93.- Página 218*

Efecto del tratamiento de estrés salino 50 mM NaCl a las 24 y 72 horas respectivamente. Se señala con flechas las regiones analizadas (raíz e hipocotilo) que mostraban signos evidentes de daño por el estrés al que fue sometida la plántula.

*Figura 94.- Página 219*

Expresión génica relativa de PsTRXf, m1 y m2, FNR y APX1 en epicotilos y las raíces de las plántulas tratadas con NaCl. La acumulación de ARNm de los diferentes genes fueron analizados por qPCR. Las semillas se empapan en agua durante 48 h hasta que aparecieron las plúmulas y luego las plántulas se transfirieron a placas que contenían 50 mM de NaCl o agua (control). Epicotilos y raíces se analizaron tras 24 h y 72 h. El contenido relativo de ARNm se normalizó con respecto al obtenido en condiciones control. Cada valor es la media de tres determinaciones de ADNc, y las barras de error las desviaciones estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a la línea silvestre (\*  $p < 0,05$  según t-Student).

*Figura 95.- Página 220*

Actividad G6PDH inducida en respuesta a la salinidad. Las actividades relativas se normalizaron con respecto al obtenido en condiciones control. Se indican las diferencias significativas con respecto a la línea control (\*  $p < 0,05$  según t-Student).

*Figura 96.- Página 221*

Reconocimiento inmunológico de las TRXs f y m1 de *P. sativum* en extractos de epicotilos pertenecientes a plantas germinadas en presencia de agua (control) y 50 mM NaCl, tras 24 y 72 h de tratamiento. En el ensayo se utilizaron 30 µg de cada extracto previamente cuantificados.

*Figura 97.- Página 222*

Complementación de una cepa de levadura deficiente en la expresión TRX (cepa EMY63, control) en condiciones de alta concentración de NaCl. El ADNc de laPsTRXf y la PsTRXm1 se clonó en el vector pFL61. (A) 30 µg de proteína soluble de cada línea se analizó mediante western-blotting. (B) Respuesta de las cepas ante una concentración 5 M de NaCl. (C) Los cultivos de levadura se sembraron a una densidad de  $10^7$  céls./mL<sup>-1</sup> y 7 µL de diluciones seriadas en medio sólido. Como control positivo se utilizó el agente oxidante hidróperóxido de terc-butilo (TBHP).

## D.- Índice de tablas.

Tabla 1.- Página 60

Oligonucleótidos usados para el aislamiento de líneas mutantes de inserción.

Tabla 2.- Página 60

Oligonucleótidos para la clonación de los genes *AtTRXf* y *AtTRXm*. En rojo las secuencias necesarias para la clonación en el vector pENTR/D-TOPO mediante sistema Gateway.

Tabla 3.- Página 61

Oligonucleótidos para clonación de las secuencias codificantes de los ADNc. Tipografía azul: cola poliG añadida para facilitar la digestión de los productos de PCR. Tipografía roja: codón de inicio de traducción. Resaltado en amarillo: lugar de la mutación puntual C35S en *TRXf1* y *TRXf2*. Subrayado en negro: secuencia diana reconocida por la enzima de restricción *NdeI*. Subrayado en rosa: secuencia diana reconocida por la enzima *BamHI*.

Tabla 4.- Página 61

Oligonucleótidos usados para análisis de expresión génica de genes de *P. sativum*.

Tabla 5.- Página 62

Oligonucleótidos usados para análisis de expresión génica de genes de *A. thaliana*.

Tabla 6.- Página 76

Anticuerpos policlonales primarios y diluciones correspondientes.

Tabla 7.- Página 80

Componentes de la solución de reacción para la determinación enzimática de la FBPasa.

Tabla 8.- Página 92

Fórmulas utilizadas para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos: clorofila a, clorofila b, clorofilas totales y carotenos.

Tabla 9.- Página 97

Componentes de la tinción histoquímica GUS.

Tabla 10.- Página 116

Nombre, secuencia de nucleótidos y números de identificación y de repeticiones de los motivos reguladores hallados en las secuencias reguladoras de los genes codificantes de TRXs f y m de *A. thaliana* mediante la herramienta de bioinformática PLACE.

Tablas 11 y 12.- Página 144

Dianas de TRX f1 (arriba) y TRXf2 (abajo) identificadas en raíces. S: número de orden de análisis; Péptido: nombre del péptido; PM, peso molecular; pl, punto isoeléctrico; N, número de péptidos; ID, número de identificación en UNIPROT; Cys, nº de cisteínas presentes en la secuencia peptídica (entre paréntesis número de puentes disulfuro descritos).

Tabla 13.- Página 148

Dianas de TRX f1 identificadas en las inflorescencias. S: número de orden de análisis; Péptido: nombre del péptido; PM, peso molecular; pl, punto isoeléctrico; N, número de péptidos; ID, número de identificación en UNIPROT; Cys, nº de cisteínas presentes en la secuencia peptídica (entre paréntesis número de puentes disulfuro descritos).

## Tabla 14.- Página 149

Dianas de TRX f2 identificadas en las inflorescencias. S: número de orden de análisis; Péptido, nombre del péptido; PM, peso molecular; pl, punto isoeléctrico; N, número de péptidos; ID, número de identificación en UNIPROT; Cys, nº de cisteínas presentes en la secuencia peptídica (entre paréntesis número de puentes disulfuro descritos).

## Tabla 15.- Página 157

Expresión relativa de los genes de los genes AtTRXf1, AtTRXf1, AtTRXm1, AtTRXm2, AtTRXm3, AtTRXm4, AtNTRC y AtTRXy1 en las líneas mutantes trxf1, trxf2, trxm1, trxm2, trxm3 y trxm4 expresadas en % respecto la expresión en las líneas silvestres Col0 y LE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  según t-student).

## Tablas 16 y 17.- Página 175

Parámetros estimados con Photosyn Assistant a partir de los valores de las curvas AQ de las líneas control y mutantes:  $\phi$ , eficiencia cuántica aparente;  $A_{max}$ , valor de fotosíntesis neta máxima;  $\Gamma_i$ , punto de compensación de luz;  $A_{sat}$ , punto estimado de saturación por luz; y  $R_{day}$ , tasa de respiración mitocondrial aparente. Todos los valores fueron obtenidos en hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Los parámetros se calcularon como media de 4 medidas independientes para cada línea y se representan las medias  $\pm$  desviación estándar de su media. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\* $p < 0,05$  según t-student).

## Tabla 18.- Página 176

Valores de Fv/Fm obtenidos de cada línea usando hojas de roseta de 25 días de crecimiento bajo condiciones de día largo. Previa medición las plantas fueron adaptadas a oscuridad. La emisión de fluorescencia basal (F0) y máxima (Fm) se obtuvieron mediante el sistema PEA. Se representan las medias de 9 plantas independientes  $\pm$  su desviación estándar. Se indica la diferencia significativa con respecto a la correspondiente línea silvestre (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  según t-student).

## Tablas 19 y 20.- Página 180

Expresión relativa de los genes AtSBP, AtcFBP1, AtAGP y AtMDH (tabla superior) y de los genes AtPRK, AtCP12-1, AtCP12-2, AtCP12-3 y AtGAPDH (tabla inferior) en las líneas mutantes trxf1, trxf2, trxm1, trxm2, trxm3 y trxm4 expresadas en % respecto la expresión en las líneas silvestres Col0 y LE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  según t-student).

## Tabla 21.- Página 187

Variación (en %) entre las líneas mutantes trxf1, trxf2, trxm1, trxm2 y trxm4 respecto a las líneas control Col0 y entre la línea mutante trxm3 respecto a la línea LE, del contenido en almidón extraído a las 0, 8 y 16 h del fotoperiodo. Se han marcado con asterisco aquellos porcentajes que representan una variación significativa (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  según t-student).

## Tabla 22.- Página 190

Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante trxf1. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

Tabla 22 (Continuación).- Página 191

Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxf2*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

Tabla 22 (Continuación).- Página 192

Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxm1*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

Tabla 22 (Continuación).- Página 193

Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxm2*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

Tabla 22 (Continuación).- Página 194

Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxm3*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

Tabla 22 (Continuación).- Página 195

Proteínas reprimidas (color claro) e inducidas (color oscuro) en la línea mutante *trxm4*. S: número de orden de análisis; Proteína: nombre de la proteína; PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; N: número de péptidos; ID: número de identificación en UNIPROT; Gen: número de Identificación AGI del gen codificante de la proteína.

Tabla 23.- Página 196

Número de proteínas diferencialmente expresadas que proteínas comunes entre los mutantes *trxf1*, *trxf2*, *trxm1*, *trxm2*, *trxm3* y *trxm4*. En verde proteínas comunes activadas, en rojo proteínas reprimidas.

Tabla 24.- Página 213

Porcentajes de homología entre las distintas isoformas de TRXs f y m de *A. thaliana* y *Pisum sativum*, obtenidos del alineamiento realizado con Clustal Omega (McWilliam et al., 2013).



